Untersuchungen zur Charakterisierung eines Spätproteins in Simian Virus 40 infizierten Affennierenzellen

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der

Abteilung für Biologie

an der

Ruhr-Universität Bochum

von

Bernd Krippl

Bochum, Juni 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549226_0042

Untersuchungen zur Charakterisierung eines Spätproteins in Simian Virus 40 infizierten Affennierenzellen

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der

Abteilung für Biologie

an der

Ruhr-Universität Bochum

von

Bernd Krippl

Bochum, Juni 1982

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie - Leiter Prof. Dr. H. Werchau - der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Werchau danke ich für die Überlassung des Themas und für die gute Betreuung. Durch viele Diskussionen wurde meine Arbeit intensiv unterstützt.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. W. Büttner möchte ich mich für seine wertvollen Ratschläge und Anregungen bedanken.

Allen Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit.

UNIV. LEIDEN BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A. ABKÜRZUNGEN 1

B. EINLEITUNG 3

C. MATERIAL UND METHODEN 11

I. Zellen und Virus 11

1. Zellen 11

2. Medien 12

3. Zellzucht 12

4. Virus 13

5. Virusvermehrung 13

6. Virustitration 13

7. Virusinfektion 14

8. Virusreinigung 14

9. Behandlung der Zellen mit 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin 16

II. Radioaktive Markierung von Proteinen 16

1. Markierung mit ^{35}S-Methionin 16

2. Markierung mit ^{3}H-Serin 16

III. Zellaufschlüsse und Extraktionen 17

1. Extraktion ohne Detergenz 17

2. Extraktion mit Detergenz 17

3. Fraktionierung und Extraktion mit Detergenz 17

IV. Analytische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation 18

V. Proteinanalysen 19

1. Proteinbestimmung 19

2. SDS-PAGE 19

3. Isolierung von radioaktiven Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen 22

4. Zwei-dimensionale Peptidanalysen 22

5. Endgruppenbestimmung von Peptiden mit Hilfe der Carboxypeptidase Y 24

VI. Immunologische Methoden 24

1. Herstellung und Gewinnung von Antiseren ... 24

2. Immunfluoreszenz 26

3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay 26

4. Immunpräzipitation 29

VII. Chemikalien und Geräte 30

D. ERGEBNISSE 33

I. Proteinsynthese in Affennierenzellen nach SV40 Infektion 33

II. Nachweis des 74K Proteins unter verschiedenen Extraktionsbedingungen 35

III. Intrazelluläre Verteilung des 74K Proteins ... 37

IV. Der Einfluß von 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin auf die Synthese des 74K Proteins 39

V. Beginn der Synthese des 74K Proteins 41

VI. Immunologische Charakterisierung des 74K Proteins 43

VII. Untersuchungen zum Nachweis des 74K Proteins in gereinigten SV40 Viren 50

VIII. Immunpräzipitation von Proteinen aus SV40 infizierten primären Affennierenzellen nach der Trennung im Sucrosegradienten 53

IX. Zwei-dimensionale Peptidanalysen der SV40 Strukturproteine und des 74K Proteins 57

1. Peptidanalysen ^{35}S-Methionin markierter Proteine 57

2. Peptidanalysen ^{3}H-Serin markierter Proteine 62

3. Zuordnung der Peptide zur Aminosäuresequenz durch den Vergleich tryptischer methionin- und serinenthaltender Peptide ... 67

4. Zuordnung der Peptide zur Aminosäuresequenz durch das Abschätzen des Wanderungsverhaltens 71

E. DISKUSSION 76

I. Darstellung und Charakterisierung des 74K Proteins 76

II. Modelle zur Entstehung des 74K Proteins 79

III. Mögliche Funktion des 74K Proteins 82

F. ZUSAMMENFASSUNG 87

G. LITERATUR 89

A. A B K Ü R Z U N G E N

AGMK	- African Green Monkey Kidney
AP	- Alkalische Phosphatase
APS	- Ammoniumpersulfat
Ara-C	- 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin
BES	- N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2-aminoehtansulfonsäure
BSA	- Rinderserumalbumin
cpe	- cytopathogener Effekt
cpm	- counts per minute
Cytosin-arabinosid	- 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin
DMEM	- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	- Dimethylsulfoxyd
DNA	- Desoxyribonucleinsäure
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- Ethylendiamintetraacetat - Na-Salz
ELISA	- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	- Fluoresceinisothiocyanat
HBSS	- Hank's balanced salt solution
HEPES	- N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethylsulfonsäure
h.p.i.	- Stunden nach Infektion
IgG	- Immunglobulin G
K	- Kilo Dalton
K.I.E.	- Kallidinogenase-Inactivator-Einheiten
m.o.i.	- multiplicity of infection
mRNS	- Boten-Ribonukleinsäure
MW	- Molekulargewicht
NKS	- Newborn Calf Serum
OR	- Origin; Ursprung der DNA Replikation
PAGE	- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	- Polyäthylenglykol
PBS	- Phosphate buffered saline
PPO	- 2,5-Diphenyloxazol
RNA	- Ribonucleinsäure
SDS	- Na-Dodecylsulfat

SV40	- Simian Virus 40
t-Antigen	- kleines Tumor-Antigen
T-Antigen	- großes Tumor-Antigen
TCA	- Trichloressigsäure
TCID	- Tissue Culture Infective Dosis
TES	- N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-amino-methansulfonsäure
TEMED	- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
VP	- Virusstrukturprotein
% w/w	- Gewichtsprozent

B. EINLEITUNG

Eine besondere Leistung des vielzelligen Organismus ist die geordnete Regulation des Wachstums und der Differenzierung verschiedenartigster Zellen. Auf diese Weise wird die Entwicklung der Zellen räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmt, so daß alle Gewebe und Organe ihre Funktion erfüllen können und der Gesamtorganismus lebensfähig ist. Maligne entartete Zellen, die den Steuerungsmechanismus für gewebs- und organspezifisches Wachstum verloren haben, teilen sich autonom. Die ungehemmte Vermehrung der Zellen kann zur Entstehung eines Tumors führen. Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle ist im allgemeinen irreversibel. Alle aus einer Tumorzelle hervorgehenden Tochterzellen weisen die gleichen Eigenschaften wie die entartete Ausgangszelle auf. Neben physikalischen und chemischen Kanzerogenen, die zu Veränderungen im genetischen Material führen, können auch spontane Mutationsereignisse den transformierten Status der Zelle auslösen. Als Erreger gutartiger und bösartiger Tumore sind Viren bei Tieren seit einigen Jahrzehnten bekannt. Für maligne Geschwülste verschiedener histologischer Provenienz gilt die Virusätiologie als gesichert. Onkogene Eigenschaften können sowohl Viren aus der Gruppe der RNA-haltigen, als auch aus der Gruppe der DNA-haltigen Viren zugeschrieben werden. Auf Grund ihrer relativ einfachen Struktur und ihres kleinen Genoms eignen sich onkogene Viren als Modellsystem, um die biochemischen Prozesse, die zu einer zellulären Transformation führen, zu studieren. Obgleich durch die Einführung neuer Techniken in die Molekularbiologie einige Aspekte der viralen Kanzerogenese detailliert beschrieben werden können, ist das Verständnis für die Beziehung zwischen Virus und Zelle noch sehr lückenhaft.

Das Simian Virus 40 (SV40) wurde 1960 von Sweet und Hillemann (Sweet and Hillemann, 1960) bei der Herstellung der Poliovakzine entdeckt. Die untersuchten Nierenzellkultu-

ren der Gattung Cercopithecus zeigten die für das Virus typische Vakuolisierung. SV40 unterhält bei Rhesusaffen oft eine latente Infektion, jedoch konnten in den Zellkulturen dieser Spezies keine cytopathischen Effekte beobachtet werden. Zwei Jahre später zeigten die Experimente von Eddy und Girardi, daß SV40 bei geeigneter Injektion in neugeborene Hamster Tumore induzieren kann (Eddy et al., 1962; Girardi et al., 1962). Die stabile Transformation in Kultur gehaltener Zellen bestätigen die onkogenen Eigenschaften des Virus (Shein and Enders, 1962). Mit den Polyoma- und den Papillomaviren wird das SV40 in die Gruppe der Papovaviren eingeordnet (Melnick, 1962). Die chemische Zusammensetzung und der physikalische Aufbau der Papovaviren ist sehr ähnlich. SV40 besitzt eine Proteinhülle mit ikosaedrischer Symmetrie (Anderer et al., 1967), dessen 72 Kapsomere sich aus den Strukturproteinen zusammensetzen. Die doppelsträngige, covalent geschlossene, zirkuläre DNA des Virus liegt im Virion als Nukleoproteinkomplex vor. Die am SV40 Chromosom nachgewiesenen wirtszellkodierten Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Histonoktamer, das als Strukturelement von Nukleosomen dient (Chambon, 1977; Kronenberg, 1977; Felsenfeld, 1978). Mit Hilfe der Methode von Maxam und Gilbert (1977) wurde die SV40 DNA von Fiers und Reddy (1978) komplett sequenziert und die Anzahl von 5224 Basenpaaren bestimmt.

Das Ausmaß der viralen Genexpression ist vom Typ der Zellen abhängig, die durch das Virus infiziert werden. In permissiven Affennierenzellen wird das Virus vermehrt. Nicht permissive Zellen (Hamster-, Mäusezellen) lassen keine Virusvermehrung zu, die Infektion kann jedoch bei einem geringen Prozentsatz der Zellen zu einer stabilen Transformation führen.

Nach Infektion permissiver Zellen mit SV40 werden die Viruspartikel von der Zellmembran umhüllt und das Virus durch das Zytoplasma an den Zellkern transportiert. Hier verschmelzen die Vesikel mit der Kernmembran. Die Dekapsidierung findet innerhalb der ersten 4 Stunden im Kern statt (Barbanti-Brodano et al., 1970; Hummeler et al., 1970; Gershey and Diacumakos, 1978).

Das SV40 Genom wird mit Hilfe zellulärer DNA-Polymerase im Kern repliziert (Tegtmeyer, 1972; Otto and Fanning, 1978). Die Verdoppelung der viralen DNA beginnt an einer definierten Stelle auf dem ringförmigen Molekül und schreitet entgegengesetzt in zwei Richtungen fort, bis sich die beiden Wachstumspunkte treffen (Bourgaux et al., 1971; Sebring et al., 1971; Jaenisch et al., 1971). Die neusynthetisierten Moleküle dienen entweder als Matrize für die weitere Replikation oder dienen als Substrat für die Kapsidierung beim Zusammenbau des Virus (Hwa-Tang Wang and Roman, 1981). Die dritte Funktion der SV40 DNA, die Realisierung der genetischen Information, ist bei der Vermehrung des Virus zeitlich geregelt.
Vor dem Beginn der DNA Replikation werden von der frühen Region des SV40 Genoms zwei mRNA Spezies transkribiert. Sie unterscheiden sich in ihrem Sedimentationsverhalten nur geringfügig. Im neutralen Sucrosegradienten konnte für beide Moleküle eine Konstante von 19S bestimmt werden (Weinberg et al., 1974). Die Transkription der frühen mRNAs beginnt im Bereich des Initiationsortes der DNA Replikation, Kartenposition 0,67, und verläuft entgegen dem Uhrzeigersinn bis zur Position 0,17 auf der physikalischen Genkarte von SV40 (siehe Abb. 1). Die aktiven mRNA Moleküle umfassen Sequenzen, die komplementär zu nicht benachbarten Abschnitten auf dem frühen Genom sind - oder molekularbiologisch ausgedrückt - die mRNAs werden im Verlauf der Prozessierung "gespliced".
Die kleinere mRNA umfaßt etwa 2.200 Nukleotide, sie kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 94.000 Daltons, dem großen Tumor-Antigen (T-Antigen). Die größere mRNA, ca. 2.500 Nukleotide lang, kodiert für das kleine Tumor-Antigen (t-Antigen, 17.000 Daltons). Beide Genprodukte können in der präreplikativen Phase lytisch infizierter Zellen als auch in stabil transformierten Zellen nachgewiesen werden. Die Funktionen dieser Proteine werden zur Zeit intensiv untersucht (Übersicht siehe Tooze, 1980; Klein, 1980). Bei der Initiation und der Aufrechterhaltung der Transformation sind das große T-Antigen und das kleine t-Antigen beteiligt (Tegtmeyer, 1975; Martin et al., 1975;

Weinberg et al., 1977; Bouck et al., 1978; Butel and Soule, 1978; Sleight et al., 1978). Der multifunktionelle Charakter des T-Antigens offenbart sich besonders deutlich im Hinblick auf die Regulation des DNA Metabolismus. Ob die erhöhte virale und zelluläre DNA Synthese durch direkte Assoziation des phosphorylierten T-Antigens ausgelöst wird, oder auch zelluläre Enzyme an diesen Prozessen beteiligt sind, ist noch unklar. Auch die Transkription des späten Genomabschnitts der SV40 DNA wird durch das T-Antigen gesteuert (Khoury and May, 1977; Graessmann et al., 1978).

In permissiven Zellen wird der Teil des SV40 Genoms, der für die Strukturproteine kodiert, nach der viralen DNA Replikation transkribiert. Die primären Transkriptionsprodukte werden nach einem ähnlichen Muster, wie es für die frühen mRNAs beschrieben werden konnte, zu aktiven Molekülen metabolisiert (Berg and Sharp, 1978; Horowitz et al., 1978; Khoury et al., 1979). Die resultierenden mRNAs kodieren die Strukturproteine. Eine 16S mRNA kodiert für das Hauptstrukturprotein VP1. Die für die Strukturproteine VP2 und VP3 kodierenden RNA Spezies sedimentieren mit 19S. Jedoch ist noch nicht geklärt, ob für jedes Protein, wie im Fall des verwandten Polyomavirus, eine einzelne individuelle mRNA kodiert (Hunter, 1979). Durch Hybridisierungsexperimente gelang es, die zytoplasmatischen RNAs den kodierenden DNA Sequenzen zuzuordnen (siehe Abb. 1). Zwei-dimensionale Peptidanalysen zeigen Übereinstimmung zwischen VP2 und VP3, nicht jedoch mit VP1. Durch diese Analysen und durch in vitro Translation der beschriebenen mRNAs konnte geschlossen werden, daß VP2 und VP3 im gleichen Leseraster vom gleichen Genomabschnitt kodiert werden (Rozenblatt et al., 1976; Cole et al., 1977).

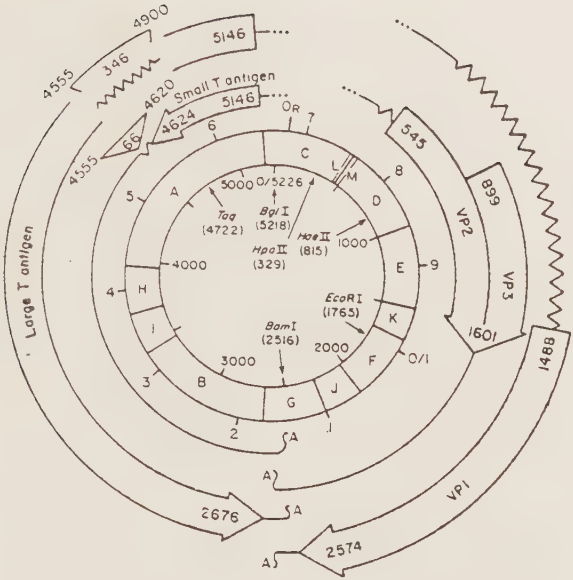


Abb. 1

Physikalische Genkarte von SV40 nach Fiers et al. (1978) Das SV40 Genom ist als Kreis dargestellt, der ausgehend von der Schnittstelle der DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI (0 bzw. 1,0) in zehn gleich große Einheiten aufgeteilt ist. Weiterhin sind die DNA Schnittstellen der Endonukleasen Hind II/III in Form von 13 Fragmenten (A bis M) auf dem DNA-Zirkel eingezeichnet. Der Ursprung der DNA Replikation (Origin = OR) liegt im Kartenbereich 0,67 im Hind II/III Fragment C. Von hieraus erfolgt in beiden Richtungen die Transkription der frühen und der späten mRNAs. Die Genprodukte der verschiedenen Abschnitte sind durch Pfeile dargestellt. Die aus den mRNAs herausgeschnittenen Nukleotide sind durch gezackte Linien gekennzeichnet.

Die Bestimmung der Folge der Aminosäuren der Strukturproteine wurde durch die Übersetzung der von Fries bestimmten Nukleotidsequenz der SV40 DNA möglich. Dadurch gelang es, die mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermittelten Molekulargewichte zu korrigieren. Für die Strukturproteine können folgende Molekulargewichte angegeben werden:
VP1: 40K (berechnet), 45-48K (ermittelt durch SDS-PAGE)
VP2: 38,5K (berechnet, 40-46K (ermittelt durch SDS-PAGE)
VP3: 27K (berechnet), 23-27K (ermittelt durch SDS-PAGE).
Schon 12 Stunden nach Infektion können die Strukturproteine in Extrakten infizierter Zellen nachgewiesen werden. Im Verlauf der Infektion erhöht sich die Synthese drastisch, sie entspricht, 40 Stunden nach Infektion, 10 - 30% der gesamten, zellulären Proteinsynthese. (Ozer, 1972; Walter et al., 1972; Seehafer and Weil, 1974). VP1 wird in weit größerer Menge synthetisiert als VP2 und VP3. Die Menge des synthetisierten VP3 ist wiederum größer als die des VP2. Etwa 10 Minuten nach ihrer Synthese werden die Proteine vom Zytoplasma in den Kern transportiert, dort werden sie während der Reifung der Viren in die Kapside eingebaut.
Das "assembly" der SV40 Virionen vollzieht sich schrittweise durch das Zusammenfügen verschiedener Strukturelemente. Der Hauptteil der neusynthetisierten DNA ist mit den zellulären Histonen H1, H2A, H2B, H3, H4 und dem T-Antigen assoziiert (Coca-Prados, 1978, 1980; Mann and Hunter, 1979). An diesem Nukleoproteinkomplex (NPCI) erfolgt sowohl RNA und DNA Synthese als auch die Anlagerung der Strukturproteine VP1 und VP3. Die Komposition des zweiten Komplexes (NPC II) unterscheidet sich durch den größeren Anteil der Strukturproteine und durch den höheren Acetylierungsgrad der Histone (Levine et al., 1978; Fanning and Baumgartner, 1980). Das dritte isolierte Intermediat ähnelt schon sehr dem reifen Virus, allerdings ist diese Zwischenstufe noch salzlabil und enthält noch das Histon H1. Schließlich erfolgt die Umlagerung der Proteine zu einer stabilen Anordnung, dem reifen Viruspartikel. Die posttranslationale Modifikation, die Phosphorylierung (Tan and

Sokol, 1972) und die Fähigkeit der VP1 Moleküle zur Ausbildung von Disulfidbrücken werden an diesem Modell studiert.
Bei der Darstellung von Polypeptiden aus SV40 infizierten Zellen, konnte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese ein Protein mit einem Molekulargewicht von 74.000 Daltons von Patschinsky identifiziert werden (Patschinsky, 1974; Patschinsky, 1978). Auf Grund der damaligen Kenntnisse wurde vermutet, daß es sich bei diesem Protein um ein frühes SV40 Genprodukt, oder um ein zelluläres, durch T-Antigen stimuliertes Protein handeln könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eigenschaften dieses 74.000 Daltons Proteins(74K Protein) näher zu untersuchen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob das 74K Protein zellulär oder viral kodiert wird. Dazu wurden Proteine aus nicht infizierten Zellen mit Proteinen aus SV40 infizierten Zellen verglichen. Um zu klären, ob das 74K Protein Bestandteil reifer Viruspartikel ist, wurden gereinigte Viren präpariert, um deren Zusammensetzung auf SDS-Gelen zu untersuchen. Durch selektive Hemmung der späten Proteine durch 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin sollte eine Beziehung zu den Strukturproteinen festgestellt werden. Mit Hilfe verschiedener Extraktionsbedingungen wurde die intrazelluläre Verteilung bestimmt, die Schlüsse über die Herkunft des Proteins zulassen sollten.
Um eine nähere Beziehung zu der zeitlich geregelten Genexpression in lytisch infizierten Zellen herzustellen, war beabsichtigt, den Beginn der Synthese des 74K Proteins zu bestimmen.
Zur immunologischen Charakterisierung wurden mit verschiedenen Antiseren Immunpräzipitationen durchgeführt, um die Klassifizierung des Proteins zu erleichtern. Diese Methode bietet auch die Möglichkeit zur präparativen Reinigung, die die Voraussetzung für weitere biochemische Analysen ist.
Zwei-dimensionale Peptidanalysen erlauben,eine strukturelle Verwandtschaft verschiedener Proteine festzustellen. Aus diesem Grund wurde das 74K Protein sowohl mit den frühen

als auch mit den späten Genprodukten von SV40 verglichen. Schließlich sollte die Möglichkeit der Beteiligung des Proteins beim Zusammenbau des Virus untersucht werden. Analytische Dichtegradienten-Zentrifugationen wurden zu diesem Zweck durchgeführt.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Zellen und Virus

1. Zellen

Primäre Nierenzellkulturen von Cercopithecus aethiops (AGMK Zellen) wurden durch Trypsinaufschluß nach Youngner (†954) hergestellt.

Die permanente, fibroblastenartige Zellinie CV-1 aus der Niere von Cercopithecus aethiops wurde über die Firma Flow Laboratories, Bonn, in der 33. Passage bezogen. Für die Experimente wurden Zellen der 35. - 45. Passage verwendet.

Die transformierte Zellinie, AGMK-EVa, wurde durch SV40 Infektion primärer AGMK Zellen mit niedrigen Virusdosen hergestellt (Koprowski et al., 1967). Sie wurde uns freundlicherweise von Prof. Sauer (Krebsforschungszentrum Heidelberg) überlassen.

SV3T3 Zellen sind SV40 transformierte Mauszellen des Stammes Swiss albino (Todaro and Green, 1963). Die Herkunft und die genauen Passagen dieser Zellen konnte nicht mehr ermittelt werden.

Die SV40 tranformierte Hamsterzellinie H65/90B wurde von V. Defendi (New York University, Medical Center) etabliert und uns dankenswerterweise von W. Deppert (Biochemisches Institut der Universität Ulm) zur Verfügung gestellt.

Die menschliche SV40 transformierte Zelle, SV80, erhielten wir von Prof. G. Walter (Institut für Immunbiologie der Albert-Ludwig-Universität, Freiburg).

2. Medien

CV-1 Zellen und SV40 transformierte Zellen wurden in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 15 mM BES, 15 mM HEPES, 15 mM TES, 15 mM $NaHCO_3$, pH 7,4 und 5.000 I.E. Penicillin/l, 50 mg Streptomycin/l und 5% Serum von neugeborenen Kälbern.

Hank's Balances Salt Solution (HBSS):
1,26 mM $CaCl_2$, 8,9 mM D-Glucose, 0,36 mM KCl, 0,38 mM $MgSO_4$, 136,9 mM NaCl, 0,33 mM NaH_2PO_4, 0,28 mM Phenolrot.

Trypsin-EDTA-Lösung:
138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4, 7 mM Na_2HPO_4, 1 mM D-Glucose, 5 mM Tris-HCl, pH 7,7, 0,4 mM EDTA, 0,0015% Phenolrot, $2x10^4$ I.E. Penicillin/l, 20 mg Streptomycin/l, 0,5 mg Trypsin/l.

Medium zur Hemmung der DNA-Synthese:
DMEM (s.o.) mit 20 µg/ 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin/ml.

3. Zellzucht

Die für die Stammhaltung eingefrorenen Zellen (-180°C) wurden schnell bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in DMEM mit 5% NKS aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bei einer Atmosphäre von 5% CO_2 und 95% Luft wurden die Zellen bei 37°C 6 bis 12 Stunden bebrütet. Danach wurden die Zellen bei normaler Atmosphäre bis zu einer Dichte von $3x10^6$ Zellen pro Petrischale weiter angezogen.
Für die Vermehrung wurden subkonfluente Zellkulturen nach Entfernung des alten Mediums mit Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen, um verbliebenes Serum zu entfernen. Mit frischer Trypsin-EDTA-Lösung wurden nun die Zellen inkubiert und nach Ablösung suspendiert. Danach wurde den Zellen frisches Medium im Verhältnis 1:3 hinzugegeben und die Zellen neu ausgesät.

HBSS mit 5% Lactatalbuminhydrolysat, 0,15% $NaHCO_3$ und 1% Hefeextrakt wurde für die Aussaat primärer AGMK Zellen verwendet. Der Nährlösung wurden 4.000 I.E. Penicillin, 1.000 I.E. Moronal, 50 mg Streptomycin und 10 mg Neomycin pro Liter zugesetzt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit Eagle's Medium (Eagle, 1959), das 5% fötales Kälberserum und Antibiotika enthielt, gefüttert.

4. Virus

Für die meisten Versuche wurde der SV40-Stamm 777 (Büttner and Werchau, 1973) verwendet. Er wurde der Sammlung des Lehrstuhls entnommen.
Der über große Plaques gereinigte SV40-Wildtypstamm wurde ursprünglich von P. Tegtmeyer isoliert. Das Virus gelangte durch Prof. G. Walter in unsere Arbeitsgruppe.

5. Virusvermehrung

CV-1 Zellen in Rouxflaschen (ca. $5x10^7$ Zellen pro Flasche) wurden mit einer Virussuspension beimpft. Die Multiplizität der Infektion betrug 0,01 $TCID_{50}$ pro Zelle. Nach 12 Stunden wurde das alte Medium abgezogen und die Zellen mit frischem DMEM (+5% NKS) gefüttert. Nach maximaler Ausbildung des cytopathischen Effekts wurden die Kulturen zweimal eingefroren und aufgetaut. Die Zellysate wurden 30 Minuten bei 12.000 x g und 4^oC zentrifugiert. Die Überstände wurden in kleinen Portionen steril abgefüllt und bis zum Gebrauch bei -20^oC gelagert. Überstände von Lysaten nicht infizierter Kulturen wurden auf die gleiche Weise hergestellt. Sie dienten bei den Versuchen zur Scheininfektion der Kontrollzellen.

6. Virustitration

Von der zu bestimmenden Virussuspension wurde eine Verdünnungsreihe in log_{10}-Stufen angelegt.

Subkonfluente CV-1 Zellkulturen wurden in 4 Parallelansätzen mit je 1 ml SV40 Suspension pro Verdünnungsstufe infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Suspensionen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Bis zum 20. Tag nach Infektion wurde die Ausbildung des cytopathischen Effekts unter dem Mikroskop verfolgt und anschließend die Viruskonzentration nach Reed und Münch (1938) bestimmt. Die Suspensionen wiesen einen Titer von 10^7 - 10^8 $TCID_{50}$/ml auf.

7. Virusinfektion

Konfluente AGMK Zellkulturen in Petrischalen (Durchmesser: 8,5 cm) wurden vor Infektion einmal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 3-4 ml SV40 Suspension beimpft. Die Multiplizität der Infektion betrug 20-40 $TCID_{50}$/Zelle. Nach zweistündiger Inkubation (Zeitpunkt null der Infektion) wurde die Virussuspension entfernt. Die Zellen erhielten dann neues Medium (DMEM mit 5% NKS). Zur Scheininfektion der Kontrollzellen wurden die Kulturen mit entsprechenden Mengen Lysats nicht infizierter Zellen inkubiert.

8. Virusreinigung

Zur Reinigung von SV40 Viren wurden CV-1 Zellen mit niedrigen Virusdosen (Multiplizität: 0,05 $TCID_{50}$/Zelle) infiziert. Auf dem Höhepunkt des CPE, etwa 100 Stunden p. i., wurden die infizierten Kulturen dreimal gefroren und aufgetaut.

Konzentrierung des Virus:
Das Zellysat wurde bei 5.000 UpM für 30 Minuten in der Minifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Ultraschall behandelt und mit TBS-Puffer, pH 7,4, (0,05 M Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl) extrahiert. Der Zellysatüberstand und der Überstand des extrahierten Sediments wurden vereinigt.

Zur Fällung der freigesetzten Virionen wurde Polyethylenglycol (PEG 6.000) bis zu einer Endkonzentration von 6% hinzugegeben. Die Mischung wurde über Nacht bei $4^{o}C$ belassen. Das Virus wurde dann bei 10.000 UpM, $4^{o}C$, 30 Min. sedimentiert. Das Sediment wurde in 1/100 des Originalvolumens resuspendiert und über Nacht gerührt, um das Virus zu eluieren. Nach dreimaliger Extraktion wurden die virushaltigen Überstände vereinigt.

CsCl-Dichte-Gradienten-Zentrifugation:
Dem Extrakt wurde kristallines CsCl hinzugegeben, bis die Dichte der Lösung 1,34 g/cm^3 betrug. Nach 39-stündiger Zentrifugation in der Beckman Zentrifuge, Rotortyp SW 41, bei 38.700 UpM stellten sich im Gradienten zwei Banden dar. Mit Hilfe eines Absorptionsmeßgerätes und eines Fraktionssammlers wurde der Gradient abgetropft und die einzelnen Fraktionen im Durchfluß bei 280 nm und bei 260 nm gemessen. Aus jeder Fraktion wurde eine Probe entnommen und die Dichte der Lösung mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt.

Infektiöse Partikel bandierten entsprechend einer Dichte von 1,33 g/cm^3, leere Kapside entsprechend einer Dichte vom 1,28 g/cm^3.

Saccharosegradienten-Zentrifugation:
Zur weiteren Virusreinigung wurden die Fraktionen, die die intakten Virionen enthielten, vereinigt und durch Zentrifugation durch einen Gradienten von 5-30% Sucrose in TBS-Puffer pH 7,4, auf ein CsCl-Polster, 1,55 g/cm^3 in 30%-iger Sucrose bandiert. Die Zentrifugation wurde ebenfalls in der Beckman Zentrifuge bei 25.000 UpM, 4 Stunden bei $4^{o}C$ durchgeführt. Der Sucrosegradient wurde abgetropft und fraktioniert. Anschließend wurde ein Teil der Fraktionen in der SDS-PAGE analysiert.

9. Behandlung der Zellen mit 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin

Zur Inhibition der viralen DNA Synthese erhielten primäre AGMK Zellen und CV-1 Zellen nach Infektion und während der radioaktiven Markierung 20 µg Cytosinarabinosid (ara-C) pro 1 ml Medium. Scheininfizierte Kontrollzellen wurden genauso behandelt.

II. Radioaktive Markierung von Proteinen

1. Markierung mit ^{35}S-Methionin

Nach Infektion wurden die Zellkulturen dreimal mit methioninfreiem Medium gewaschen. Zur Markierung erhielten die Zellen 9,3 - 0,6 mCi ^{35}S-Methionin (800 - 1.000 Ci/mMol) in methioninfreiem DMEM pro $5x10^6$ Zellen.

2. Markierung mit ^{3}H-Serin

Die Markierung mit ^{3}H-Serin wurde in serinfreiem DMEM, das zusätzlich zu der radioaktiven Verbindung (0,6 mCi ^{3}H-Serin/ml), die nicht essentiellen Aminosäuren Alanin, Prolin, Glutamin, Asparagin und Asparaginsäure (4 mM) enthielt, vorgenommen.

Der Beginn und die Dauer der Markierungen sind im Text angegeben.

III. Zellaufschlüsse und Extraktionen

1. Extraktion ohne Detergenz

Am Ende der Markierungszeiten wurden die Monolayerkulturen dreimal mit TD-Puffer, pH 7,4, (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM KCl) gewaschen. Die Zellen wurden in TD-Puffer mit 0,02% EDTA geerntet und durch anschließende niedertourige Zentrifugation pelletiert. Die Extraktion der Zellen wurde durch dreimaliges Frieren und Tauen in Tris-Extraktionspuffer, pH 9,0, (80 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl) in Anlehnung an die Methode von Carroll et al., 1976 durchgeführt. Die unlöslichen Proteine wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g abgetrennt.

2. Extraktion mit Detergenz

Nach Waschen der Zellkulturen wurden die Zellen drei Minuten in Lysis-Puffer, pH 7,4, (0,15 M NaCl, 1% NP40, 1% NaDoc, 0,1% SDS, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4) inkubiert. Die Zellysate wurden gesammelt und für 5 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde für die anschließenden Experimente verwendet.

3. Fraktionierung und Extraktion mit Detergenz

Kern- und Zytoplasmafraktionen wurden mit dem nicht-ionischen Detergenz NP40 gewonnen (Walter et al., 1972). Dazu wurden die Zellen dreimal mit isotonischem Tris-Puffer, pH 7,4, (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen. Die Zellen wurden im gleichen Puffer mit 0,5% NP40 lysiert. Nach 10 Minuten Inkubation wurde das Lysat bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert.

Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment (NP40 Kerne) wurde entweder in SDS-Elektrophorese-Probenpuffer aufgenommen oder mit Tris-Puffer, pH 9,0, extrahiert. Der Überstand (NP40 Zytoplasma) wurde in einigen Experimenten durch Zentrifugation bei 100.000 x g von allen partikulären Bestandteilen befreit.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit extrahierter Proteine vom pH-Wert und der Ionenstärke wurden diese Parameter in den oben beschriebenen Extraktionspuffern stufenweise verändert.

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt; zur Hemmung von Proteasen enthielten alle Lösungen 10 K.I.E./ml Aprotinin.

IV. Analytische Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Auftrennung monomerer und komplexierter Proteine wurden SV40 infizierte Zellextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion durch ihr Sedimentationsverhalten im Sucrosegradienten charakterisiert.
150 µl Probenmaterial (pH 9,0 Extrakt aus SV40 infizierten, ^{35}S-Methionin markierten AGMK Zellen) wurden auf einen vorgeformten 5-30%-igen Sucrosegradienten in Tris-Puffer, pH 9,0, geschichtet. Der Gradient wurde 15 Stunden bei 29.000 UpM (Rotortyp SW 41) zentrifugiert. In einem anderen Experiment wurde die Zentrifugation 55 Minuten bei 44.000 UpM im gleichen Rotor durchgeführt. Parallel wurden als Marker Proteine mit bekannten S-Werten aufgetrennt: Cytochrom c, 120 µg/ml; ß-Galaktosidase, 100 µg/ml; Lactatdehydrogenase, 100 µg/ml. Zusätzlich wurde gereinigtes, radioaktiv markiertes SV40 mitgeführt. Es diente zur Identifikation reifer Partikel in infizierten Zellextrakten.
Nach der Zentrifugation wurde der Gradient abgetropft und fraktioniert. Die Dichte der Lösungen wurde mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt. Die Fraktionen wurden immunpräzipitiert und anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

V. Proteinanalysen

1. Proteinbestimmung

Nach Lowry (1951):

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der unbekannten Lösung Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Endkonzentration von 20% hinzugegeben. Die gefällten Proteine wurden dreimal mit Aceton gewaschen. Das trockene Proteinsediment wurde in 0,1 N NaOH-1% SDS gelöst und die Konzentration im Autoanalyzer (Technicon, Bad Vilbel) bestimmt.

Mit Coomassie Blue:

Die Methode nach Bradford (1976) wurde in einer modifizierten Form verwendet (Sedmak und Grossberg, 1977). Die Proteinlösung (0,5 ml) wurde mit Coomassie Blue G 250 (0,06% in 2,2%-iger HCl, Serva, Heidelberg, 0,5 ml) vermischt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 620 nm in einem Zeiss-Spektralphotometer, Typ PMQ II, gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve mit BSA bestimmt.

2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Lösungen und Gelzusammensetzung:

Probenpuffer:
62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 3% SDS, 5% ß-Mercaptoäthanol, 10% Glycerin, 0,0005% Bromphenolblau.
Elektrodenpuffer:
25 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS.
Sammelgel:
5% Acrylamid, 0,14% Bisacrylamid, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,03% APS, 0,1% TEMED.

Trenngel:
10% Acrylamid, 0,27% Bisacrylamid, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,05% TEMED.

Anfertigung der Gele:

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Maizel (1971) und Laemmli (1970) hergestellt. Das Format der analytischen Flachgele hatte die Dimensionen 90 x 140 x 1 mm. Für die präparative Trennung wurden Gele mit einer Dicke von 2 mm angefertigt.

Vorbehandlung der Proben:

Nach Säurefällung der Proteine wurden die Proben im Elektrophoresepuffer, pH 6,8, aufgenommen und gelöst. Um die Proteine vollständig zu denaturieren und um eventuelle Proteasen zu inaktivieren, wurden die Proben 3 Minuten bei 100°C erhitzt. In einigen Fällen wurde die Proteinlösung für die Elektrophorese mit dem gleichen Volumen 2 x konz. Probenpuffer versetzt und wie oben beschrieben behandelt.

Durchführung der SDS-PAGE:

Die polymerisierten Gele wurden an den Laufkammern der Elektrophoreseapparatur angebracht, und die Puffertanks mit Elektrodenpuffer, pH 8,8, gefüllt. Für den analytischen Lauf wurden 10 - 30 µg Protein pro Geltasche aufgeladen. Die Trenndauer betrug bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA 3,5 - 4 Stunden.

Fixierung und Färbung der Gele:

In einer Fixier- und Färbelösung mit 40% Methanol- 10% Eisessig- 0,1% Coomassie Blue wurden die Gele für 5 Minuten bei 60°C inkubiert; anschließend wurde bei der gleichen Temperatur 30 Minuten mit 5% Methanol- 7,5% Eisessig entfärbt, die Gele getrocknet oder für die Fluorographie vorbehandelt.

Fluorographie:

Zur Vorbehandlung für die Fluorographie (Bonner and Laskey, 1974) wurden die Gele eine Stunde in DMSO entwässert und anschließend 3 Stunden in 20% PPO in DMSO (w/w) inkubiert. Die Gele wurden dann getrocknet und auf einen Röntgenfilm gepreßt. Nach geeigneter Expositionsdauer bei -70°C wurden die Filme entwickelt und fixiert. Die Röntgenfilme wurden durch kurzes Belichten sensitiviert (Laskey and Mills, 1975).

Molekulargewichtsbestimmung:

Parallel zu den zu untersuchenden Proben wurde ein Gemisch von Eichproteinen bekannter Molekulargewichte in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die verwendeten Eichproteine mit ihren Molekulargewichten in Kilodaltons waren im Einzelnen:

ß-Galaktosidase (E. coli)	-130K
Phosphorylase a (Kaninchenmuskel)	-97K
Conalbumin	-86K
Rinderserumalbumin	-68K
Katalase (Rinderleber)	-60K
Glutamat-Dehydrogenase (Rinderleber)	-53K
Ovalbumin (Hühnerei)	-45K
Aldolase (Kaninchenmuskel)	-40K
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	-29K
Chymotrypsinogen (Rind)	-25K
Myoglobin (Wal)	-17K
Cytochrom c (Pferdeherz)	-12K

3. Isolierung von radioaktiven Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen

Aus den getrockneten Gelen wurden die Streifen, die den identifizierten Banden auf den Autoradiogrammen entsprachen, ausgeschnitten. Die Gelstreifen wurden von Filterpapierresten befreit. Das Gel wurde in 50 mM NH_4HCO_3, 10% ß-Mercaptoäthanol, 3% SDS homogenisiert. Die Elution geschah bei 37°C unter ständigem Rühren; nach 3 Stunden waren 90% der Proteine eluiert. Der Gelbrei wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und die Eluate für die folgenden Experimente verwahrt.

4. Zwei-dimensionale Peptidanalysen

(Nach Gibson, 1974; in der Modifikation von Deppert und Walter, 1976)
Die aus präparativen Gelen eluierten, markierten Proteine wurden durch TCA gefällt und anschließend mit Äthanol und Äthanol-Äther dreimal gewaschen.

Perameisensäureoxidation:

Das trockene Proteinsediment wurde mit 150 µl Perameisensäure 2 Stunden bei 0°C oxidiert. Dazu wurde die Perameisensäure durch Inkubation von 1 Volumen 30% H_2O_2 und 9 Volumen 99% Ameisensäure hergestellt. Das Reagenz wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur und 15 Minuten bei 0°C belassen (Hunter, 1979). Die Probelösungen wurden mit 4 ml Wasser verdünnt und sofort lyophilisiert.

Tryptischer Verdau:

Die oxidierten Proteine wurden in 0,5 ml NH_4HCO_3-Puffer, pH 7,9 - 8,0, gelöst. Danach wurden 30 µg TPCK-behandeltes Trypsin (Worthington, 37E833, 1 mg/ml in 50 mM NH_4HCO_3) hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Die Proteine wurden in einem ersten Schritt für 5 Stunden bei 37°C verdaut. Danach wurden 20 µl der vorherigen Trypsinlösung zugesetzt und nochmals für 5 Stunden bis zum vollständigen Verdau inkubiert.

Durch mehrmalige Lyophilisation wurde das Ammoniumhydrogencarbonat aus den Proben entfernt, und die Peptide wurden in 0,5 ml Elektrophoresepuffer, pH 4,7, aufgenommen. Nach dem Resuspendieren der Proben wurde nochmals lyophilisiert. Schließlich wurden die Peptide in 10 µl Elektrophoresepuffer, pH 4,7, gelöst.

Elektrophorese:

Zur Auftrennung in der ersten Dimension wurde eine Elektrophorese im Elektrophoresesystem "Desaphor" auf Dünnschicht-Zellulose-Platten durchgeführt. Die Platten hatten die Ausmaße 20 x 20 cm und eine Schichtdicke von 0,1 mm. Als Puffer diente ein Gemisch aus Butanol-Pyridin-Essigsäure-H_2O, pH 4,7, (Volumenverhältnis: 2:1:1:36). Nach Befeuchten der DC-Platte wurde die Probe in 0,25 µl Portionen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für 35 Minuten bei 1.000 Volt. Nach der Elektrophorese wurden die Platten über Nacht getrocknet.

Chromatographie:

Senkrecht zur ersten Trennrichtung wurde eine aufsteigende Chromatographie für 6 Stunden bei R.T. durchgeführt. Als Puffer diente ein Gemisch aus Butanol-Pyridin-Essigsäure-H_2O, pH 5,3 (Volumenverhältnis: 97:15:15:60).

Parallel zur Auftrennung der Peptide wurde in beiden Dimensionen ein Farbmarker mitgeführt (5 mg Xylen Cyanol FF, 0,5 mg DNP-Lysin/ml). Die Dünnschichtplatten wurden zur Fluorographie in flüssiges 2 Methylnaphtalin-0,4% PPO eingetaucht. Auf die so behandelten Platten wurde ein Röntgenfilm gelegt und für die Dauer der Exposition bei -70°C gelagert.

5. Endgruppenbestimmung von Peptiden mit Hilfe der Carboxypeptidase Y

Die Serin-Protease Carboxypeptidase Y aus der Hefe, (Boehringer, Mannheim) wurde zur limitierten Proteolyse von gereinigten, markierten Proteinen verwendet. Nach Perameisensäureoxidation, wie unter V.4. beschrieben, wurden die lyophilisierten Proteine in 0,4 ml Pyridin-Acetat, 0,1 M, pH 6,0, über Nacht gelöst. Zu jeder Probe wurden 15 µl Carboxypeptidase Y (1 mg/ml in H_2O) hinzugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Teil der Lösung mit TCA versetzt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugieren bei 15.000 x g, 4°C abgetrennt. Die Radioaktivität der freigesetzten Aminosäuren wurde im löslichen Überstand bestimmt. Die Aminosäuren wurden durch Elektrophorese und Chromatographie identifiziert.

VI. Immunologische Methoden

1. Herstellung und Gewinnung von Antiseren

Zur immunologischen Charakterisierung von Proteinen wurden in verschiedenen Tierspezies Antikörper gegen das betreffende Antigen hergestellt. Als Kontrolle dienten Seren nicht immunisierter, gesunder Tiere.

Hamster Anti SV40-Tumor-Serum (Hamster Anti T-Serum):

Jungen Hamstern wurden $5x10^6$ H65/90B Zellen pro Tier subkutan in den vorderen Teil des Rückens injiziert. Nach Entwicklung des Tumors wurden die Tiere entblutet und das Serum gewonnen.

Kaninchen Anti VP1-Serum:

Das durch SDS-Gelelektrophorese gereinigte Strukturprotein VP1 wurde in HBSS gelöst und mit komplettem Freund's Adjuvans im Verhältnis 1:1 emulgiert. Die Injektion erfolgte subkutan in je viermal 0,25 ml Portionen in die Flanken der Tiere. In Abständen von zwei Wochen wurden die Kaninchen dreimal reimmunisiert. Zur Primärimmunisierung wurden ca. 400 - 600 µg gereinigtes Protein appliziert; zur Boosterung wurde die Hälfte der Menge inokuliert. Das Antiserum wurde schließlich 3 Wochen nach der 4. Injektion gewonnen. Das portionierte Serum wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Maus Anti VP1-Serum:

Als Antigenquelle für die Herstellung von Mäuseseren wurde VP1 aus gereinigten Viren isoliert. Eine positive Immunantwort der Tiere konnte durch dreimalige Injektion von insgesamt 150 µg Protein pro Maus erreicht werden. Zur Serumgewinnung wurde das Blut aus dem Augenhintergrund entnommen.

Ziege Anti SV40-Serum:

Das gegen gereinigtes SV40 hergestellte Ziegenserum wurde von der Firma Miles Laboratories, Elkhardt, USA, bezogen.

Meerschweinchen Anti VP3-Serum:

SDS-denaturiertes VP3 wurde zur Präparation des Meerschweinchenserums verwendet. Das Serum wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. W. Deppert (Biochemisches Institut der Universität Ulm) überlassen.

Alle aufgeführten Seren wurden nach Inaktivierung des Komplements (30 Minuten bei 56°C) in der Immunfluoreszenz ausgetestet.

2. Immunfluoreszenz

Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Antiseren wurden von der Firma Dynatech, Plochingen gekauft. Folgende Seren wurden verwendet: Ziegen Anti Hamster-IgG, Ziegen Anti Kaninchen-IgG, Kaninchen Anti Maus-IgG und Kaninchen Anti Ziege-IgG.

Für die indirekte Immunfluoreszenz nach Gilden (1965) wurden SV40 infizierte Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,9 mM $CaCl_2$, 8,4 mM Na_2HPO_4, 1,1 mM KH_2PO_4, pH 7,4) wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton fixiert. Vor Inkubation der Kulturen mit Immunseren (30 Minuten, 37°C) wurde nochmals mit PBS gewaschen. Die nicht adsorbierten Serumbestandteile wurden entfernt, und die konjugierten Seren hinzugegeben. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37°C und anschließendem Waschen in PBS konnten die Präparate im Auflichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) betrachtet werden.

3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA (Kearney, Radbruch, Liesengang, Rajewski, 1979) eignet sich gut zur Titrierung monospezifischer Seren. Dazu wird das Antigen an eine feste Phase gebunden und mit dem korrespondierenden Antikörper inkubiert. Anschließend wird ein gegen diesen Antikörper gerichteter Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert ist, zugegeben; bindet sich dieser zweite Antikörper an den ersten, so kann man die Reaktion durch Zugabe des Substrats für die AP sichtbar machen (Farbreaktion).

Puffer für den ELISA:

Inkubationspuffer, pH 7,2 : 50 mM Phosphat, pH 7,2, 0,1 M NaCl, 1% Albumin, 0,05% Tween 20, 0,02% Na-Azid.
Waschpuffer: 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20, 0,02% Na-Azid.
Substratpuffer, pH 9,6 : Diaethanolamin 9,6%, 0,3 mM $MgCl_2$.
Dem Puffer wurde vor Gebrauch 1,69 mg/ml p-Nitrophenylphosphat-dinatriumsalz zugesetzt.

Der Test wurde im einzelnen wie folgt durchgeführt: Mikrotiterplatten (Flow, Bonn) wurden mit pH 9,0 Extrakten infizierter und scheininfizierter Zellen (200 µl/Loch) beschickt und über Nacht bei Raumtemparatur inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Um unspezifische Bindungen auf der Mikrotiterplatte zu verhindern, wurden 0,3 ml Inkubationspuffer hinzugesetzt und mit den gleichen Volumen Waschpuffer nachgespült. Die Seren wurden in einer dekadischen Verdünnungsreihe zugegeben und eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt und nochmals mit 0,3 ml gewaschen. Als nächster Schritt wurde nun der AP-konjugierte Antikörper (200 µl) eingesetzt. Im Anschluß an die Inkubation (1 Stunde, 37°C) wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Farbentwicklung wurden die Platten im letzten Schritt mit Substratpuffer (200 µl) inkubiert (37°C). Die Färbung wurde bei 405 nm gemessen (Titertek Multiscan, Flow, Bonn).

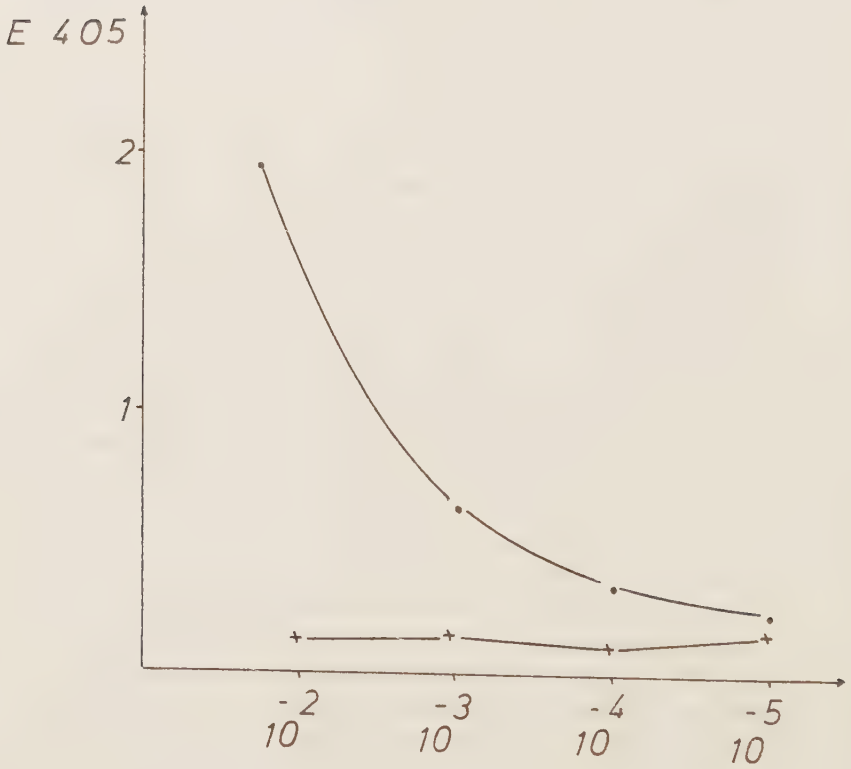


Abb. 2

Nachweis der Bindung des VP1-Antikörpers an Extrakte aus SV40 infizierten CV-1 Zellen. Die Abszisse gibt die Verdünnung des Serums wieder. Auf der Ordinate ist die Extinktion bei 405 nm eingetragen.

· Maus Anti VP1-Serum
+ Maus Praeimmunserum

4. Immunpräzipitation

Die Präzipitation von Antigen-Antikörperkomplexen wurde nach der von Kessler (1975) beschriebenen "Protein A Antikörper Adsorbens Technik" durchgeführt.
Die IgG-Moleküle des Immunkomplexes wurden über die Fc-Stücke an das in der Zellwand von Staphylokokken enthaltene Protein A gebunden und präzipitiert. Diese Methode bietet den Vorteil, daß auf die Verwendung von Anti-IgG-Antiseren verzichtet werden kann.

Vorbereitung der Staphylokokkensuspension:

Staphylococcus aureus, Stamm Cowan I, wurde in Formaldehyd (1,5%) fixiert und für 5 Minuten auf 80°C erhitzt. Die Bakterien wurden in Phosphat-Puffer, pH 7,2 (150 mM NaCl, 40 mM Na_2HPO_4-NaH_2PO_4, 0,05% Na-Azid) aufgenommen und auf eine Konzentration von 10% (v/v) eingestellt. Die portionierten Suspensionen wurden bei -70°C gelagert. Für die Immunpräzipitation wurden die aufgetauten Bakteriensuspensionen dreimal in NET-Puffer, pH 7,4 (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl) gewaschen und im selben Puffer 10%-ig resuspendiert.

Durchführung der Immunpräzipitation:

100 µl Zellextrakt ($1x10^6$ Zellen) wurden für 4 Stunden mit 5 - 15 µl Antiserum bei 4°C inkubiert. Danach wurden 100 µl 10%-iger Staphylokokkensuspension hinzugegeben und der Ansatz für weitere 2 Stunden bei 4°C belassen. Die präzipitierten Immunkomplexe wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei 12.000 x g pelletiert. Die Sedimente wurden dreimal mit NET-Puffer, pH 7,4, mit den folgenden Konzentrationen an NP40: 0,1%, 0,05%, 0,005% gewaschen. Die Präzipitate wurden in 75 µl Elektrophoreseproben-Puffer, pH 6,8, aufgenommen und 3 Minuten bei 100°C erhitzt. Die Antigene wurden 12 Stunden bei Raumtemperatur von dem Protein A eluiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 x g wurde der Überstand für die Analyse in der SDS-PAGE verwendet.

VII. Chemikalien und Geräte

Chemikalien:

Acrylamid	- Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	- Pharmacia, Freiburg
Ammoniumpersulphat (APS)	- Serva, Heidelberg
Aprotinin	- Novo Industrie, Mainz
1-ß-D-Arabinofuranosyl-cytosin (ara-C)	- Sigma, Taufkirchen
Bayol	- Serva, Heidelberg
N,N-bis (2-Hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure	- Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	- Serva, Heidelberg
Carboanhydrase	- Serva, Heidelberg
Carboxypeptidase Y	- Boehringer, Mannheim
Chymotrypsinogen a	- Serva, Heidelberg
Coomassie brillant blue R 250	- Serva, Heidelberg
Cytochrom c	- Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	- Riedel de Haen, Köln
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	- Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DDT)	- Sigma, Taufkirchen
DNP-Lysin	- Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM)	- Gibco Bio-Cult, Karlsruhe
ß-Galaktosidase	- Boehringer, Mannheim
Glutamatdehydrogenase	- Boehringer, Mannheim
Glycin	- Sigma, Taufkirchen
Harnstoff, ultrapure	- Becton, Heidelberg
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	- Sigma, Taufkirchen
Katalase	- Serva, Heidelberg
ß-Mercaptoäthanol	- Serva, Heidelberg
Methionin	- Sigma, Taufkirchen
N-Methylen Bisacrylamid	- Serva, Heidelberg
Methylnaphthalen	- Baker, Groß-Gerau
Myoglobin	- Serva, Heidelberg

Na-Desoxycholat	- Sigma, Taufkirchen
Na-Dodecylsulfat (SDS)	- Serva, Heidelberg
Newborn calf serm (NKS)	- Gibco Bio-Cult, Karlsruhe
Nonidet P 40 (NP40)	- Shell Chemie, Stuttgart
Ovalbumin	- Serva, Heidelberg
Penicillin, Na-Salz	- Serva, Heidelberg
Phenolrot	- Serva, Heidelberg
Phosphorylase a	- Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	- Serva, Heidelberg
Saccharose	- Merck, Darmstadt
Streptomycin	- Serva, Heidelberg
N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES)	- Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	- Serva, Heidelberg
Trypsin	- Difco, Frankfurt/Main
TPCK-Trypsin	- Worthington, USA

Alle anderen Chemikalien stammten entweder von Baker, Groß-Gerau; Merck, Darmstadt; Riedel de Haen, Köln; oder von Serva, Heidelberg. Die verwendeten Reagenzien waren analysenrein.

Radioaktive Chemikalien:

^{35}S-Methionin (spezifische Radioaktivität: 700-1.000 mCi/mMol) und ^{3}H-Serin (spezifische Radioaktivität: 16,8 Ci/mMol) wurden von New England Nuclear, Dreieichenhein, bezogen.

Röntgenfilm X-Omat R Film (XR-5), Röntgenentwickler LX 24 und Röntgenfilmfixierer AL 4 wurden von Kodak, Stuttgart, gekauft.

Geräte:

Geräte für die SDS-PAGE:

Apparatur für die vertikale Flachgel-Elektrophorese: Nach Reid und Bielski (1968) in der Modifikation von Studier (1973).

Trocknungsgerät: Biorad, Laboratories GmbH, München.

Flüssigkeitsscintillations-Spektrometer: Tri-Carb, Modell 2450: Packard Instruments, Frankfurt.

Ultraschallgerät: Branson Sonifier B 12: Branson Instruments Inc. Conneticut, U.S.A.

Autoanalyzer: Technicon GmbH, Bad Vilbel.

Auflichtmikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung: Zeiss, Oberkochem.

Zeiss-Spektralphotometer, Typ PMQ II: Zeiss, Oberkochem.

Titertek, Multiscan: Flow Laboratories, Bonn.

Durchfluß-Absorbtionsmeßgerät Uvicord I und Uvicord II: LKB Instruments GmbH, Gräflingen.

Fraktionssammler UltraRac: LKB Instruments GmbH, Gräflingen.

Desaga-System, Desaphor, für die Horizontal-Elektrophorese: Desaga, Heidelberg.

Desaga Spannungsgerät 1.200/200: Desaga, Heidelberg.

Laborzentrifuge "Minifuge": Heraeus-Christ, Osterode.

Kühlzentrifuge J-21B (Rotortypen: JA-20 und JA-21) und Ultrazentrifuge L5-75 (Rotortypen: SW 27 und SW 41): Beckman Instruments, München.

D. E R G E B N I S S E

I. Proteinsynthese in Affennierenzellen nach SV40 Infektion

Virusspezifische Veränderungen der Proteine in SV40 infizierten Affennierenzellen wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Dazu wurden Extrakte nicht infizierter Zellen mit Extrakten infizierter Zellen verglichen.
Alle Kulturen wurden 12 Stunden vor der Extraktion mit ^{35}S-Methionin markiert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach SV40 Infektion geerntet und in Tris-Puffer, pH 9,0, extrahiert. Die löslichen Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fluorogramm eines SDS-Polyacrylamidgels in Abb. 3 zeigt die Proteinmuster nicht infizierter und SV40 infizierter permanenter Affennierenzellen. Neben den Strukturproteinen VP1 und VP3 kann in infizierten CV-1 Zellen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 74.000 Daltons (74K Protein) nachgewiesen werden (Abb. 3 : B). In Extrakten nicht infizierter Zellen wurde dieses Protein nicht gefunden (Abb. 3 : A). Proteine, die mit einer ähnlichen Mobilität wie das 74K Protein wandern, konnten durch Verwendung von SDS-Gelen anderer Zusammensetzung voneinander getrennt werden. Die Synthese des Virusproteins VP2 ist im Vergleich zu der der Virusproteine VP1 und VP3 gering. Bei der hier durchgeführten ein-dimensionalen Auftrennung infizierter Zellextrakte konnte daher das VP2 nicht dargestellt werden. Auch der Nachweis der frühen Proteine des Virus (T-Antigen, t-Antigen) ist durch diese Methode allein nicht möglich. Beim Vergleich der Proteinmuster sind in infizierten Zellen auch Veränderungen zu beobachten, die auf eine verminderte Synthese zellulärer Proteine durch die Infektion mit SV40 hinweisen. Im weiteren soll jedoch auf diese Befunde nicht weiter eingegangen werden.

Abb. 3

Fluorogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels mit Proteinen aus nicht infizierten und SV40 infizierten CV-1 Zellen. 36 h.p.i. wurden die Kulturen mit ^{35}S-Methionin (250 µCi in 3 ml methioninfreiem DMEM/5x10^6 Zellen) für 12 Stunden markiert. 48 h.p.i. wurden die Zellen geerntet und mit Tris-Puffer, pH 9,0, extrahiert. Die Extrakte wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x konz. Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt.

A: pH 9,0 Extrakt nicht infizierter CV-1 Zellen
B: pH 9,0 Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen

Die Strukturproteine und das 74K Protein wurden auch in Extrakten SV40 infizierter primärer Affennierenzellen nachgewiesen. Unterschiede zum Proteinmuster permanenter Zellen wurden nicht beobachtet. Auch die Infektion der Zellen mit einem anderen Virusstamm führte in dieser Hinsicht zu keinen feststellbaren Veränderungen.
In SV40 transformierten Zellen wird die späte Region des SV40 Genoms nicht transkribiert. So konnte in keiner der untersuchten Zellen (AGMK-EVa, SV3T3, H65/90B, SV80) die Synthese der Strukturproteine nachgewiesen werden; auch das 74K Protein konnte in Extrakten dieser transformierten Zellen nicht identifiziert werden.

II. Nachweis des 74K Proteins unter verschiedenen Extraktionsbedingungen

Zur Charakterisierung des 74K Proteins war es notwendig, geeignete Bedingungen zur Extraktion des Proteins zu finden, um in weiteren Experimenten Analysen im präparativen Maßstab durchführen zu können. Durch Veränderungen verschiedener Parameter in den verwendeten Puffersystemen wurde die Möglichkeit einer artifiziellen Entstehung des 74K Proteins untersucht.
Nach Aufschluß SV40 infizierter Zellen (Carroll and Smith, 1976) wurden die Proteine in Tris-Puffer, pH 9,0, bei verschiedenen Salzkonzentrationen extrahiert. Die Abb. 4 zeigt die löslichen Proteine, die mit Hilfe unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen extrahiert werden konnten. In allen so gewonnenen Extrakten wurde das 74K Protein nachgewiesen. Jedoch konnte bei NaCl-Konzentrationen, die physiologischen Bedingungen entsprachen, das 74K Protein besser extrahiert werden als bei niedrigen oder hohen Salzkonzentrationen (Abb. 4 : B). Auch in den nicht löslichen Fraktionen wurde das 74K Protein identifiziert, jedoch mußte auf eine Quantifizierung verzichtet werden, da auch durch Erhitzen auf 100°C im Elektrophoresepuffer, pH 6,8, die Proteine nicht vollständig gelöst werden konnten. Die Aggregate wanderten nur zum Teil in das Trenngel der verwendeten diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgele.

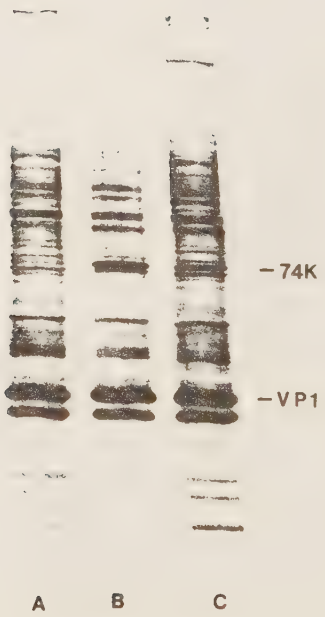


Abb. 4

Fluorogramm eines 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgels mit Proteinen von SV40 infizierten CV-1 Zellen. Nach radioaktiver Markierung von der 36.- 48.h.p.i. wurden die Zellen nach der Methode von Carroll (1976) aufgeschlossen und in Tris-Puffer, pH 9,0, durch unterschiedliche NaCl-Konzentrationen extrahiert.

A: pH 9,0 Extrakt, 10 mM NaCl, von SV40 infizierten CV-1 Zellen

B: pH 9,0 Extrakt, 140 mM NaCl, von SV40 infizierten CV-1 Zellen

C: pH 9,0 Extrakt, 500 mM NaCl, von SV40 infizierten CV-1 Zellen

Extrakte, die durch stufenweise Änderung des pH-Wertes im Tris-Puffer gewonnen wurden, zeigten bei neutralem und saurem pH-Wert starke Veränderungen des gesamten Proteinmusters. Obwohl alle Extraktionsschritte bei 4° C durchgeführt wurden und den Puffern Proteasehemmer zugesetzt worden waren, konnte die Freisetzung oder die Aktivierung proteinspaltender Enzyme nicht ausgeschlossen werden. Im Bereich von pH 9,0 bis pH 7,4 wurde das 74K Protein nachgewiesen. Die Änderung der Konzentrationen von Äthylendiamintetraacetat, Dithiothreitol und ß-Mercaptoäthanol im Tris-Puffer, pH 9,0, zeigten keinen Einfluß auf das Verhalten des 74K Proteins (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, daß beim Aufschluß der Zellen durch Frieren und Tauen nach der oben beschriebenen Methode unspezifische Aggregationen zur Entstehung des 74K Proteins führen, wurden infizierte Zellen durch dreiminütige Inkubation im Lysis-Puffer, pH 7,4, aufgeschlossen (Hunter et al., 1978). Die Zellysate wurden gesammelt und für 5 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde für die Analysen in der SDS-PAGE verwendet. Auch unter diesen Bedingungen konnte in Extrakten infizierter Affennierenzellen das 74K Protein dargestellt werden.

III. Intrazelluläre Verteilung des 74K Proteins

Hinweise auf eine mögliche biologische Funktion von Proteinen können durch den Nachweis der Proteine in verschiedenen Zellkompartimenten erhalten werden.
Zu diesem Zweck wurden Kern- und Zytoplasmafraktionen SV40 infizierter Zellen mit dem nicht ionischen Detergenz NP40 gewonnen. Die anschließende Auftrennung der Proteine zeigt deutlich, daß das 74K Protein zum überwiegenden Teil im Kern infizierter Zellen lokalisiert ist (Abb. 5 : B). Außerdem fällt in dieser Fraktion die besonders prominente Bande des VP1 auf. Zwar konnte das 74K Protein auch im Zytoplasma identifiziert werden (Daten nicht gezeigt), doch in der durch hochtourige Zentrifugation erhaltenen Fraktion (100.000 x g Überstand) konnte das Protein nicht nachgewiesen werden (Abb. 5 : D).

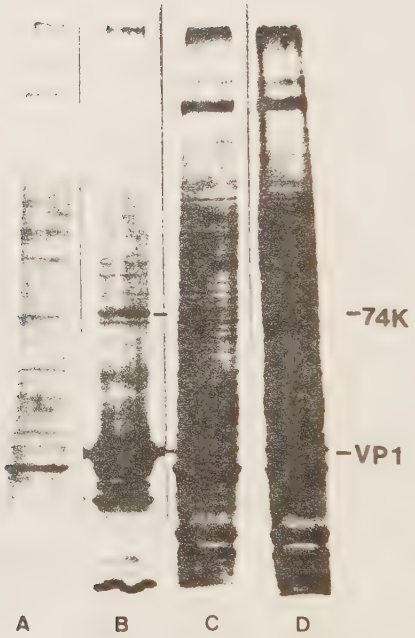


Abb. 5

Fluorogramm eines 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgels mit Proteinen aus verschiedenen Fraktionen von CV-1 Zellen, die nach SV40 Infektion bzw. Scheininfektion von der 36.- 48. h.p.i. mit ^{35}S-Methionin (400 µCi/5x10^{6} Zellen) markiert wurden.
Die Zellen wurden mit NP40 in isotonischem Tris-Puffer, pH 7,4, in Kern- und Zytoplasmafraktionen aufgetrennt. Die Kerne wurden im Tris-Puffer, pH 9,0, extrahiert, die Zytoplasmafraktionen wurden bei 100.000 x g zentrifugiert.

A: Kernextrakt nicht infizierter CV-1 Zellen
B: Kernextrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen
C: Zytoplasmafraktion, 100.000 x g Überstand nicht infizierter CV-1 Zellen
D: Zytoplasmafraktion, 100.000 x g Überstand SV40 infizierter CV-1 Zellen

Die Proteinsynthese findet im Zytoplasma statt; da das 74K Protein im Kern infizierter Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde durch diese Experimente geschlossen, daß das 74K Protein eine hohe Affinität zum Zellkern besitzt.
Die Strukturproteine des Virus zeigten eine gleiche intrazelluläre Verteilung wie das 74K Protein. Das ähnliche Verhalten der Strukturproteine war unter anderem Ausgangspunkt, die Beziehung des 74K Proteins zu den Strukturproteinen zu untersuchen.

IV. Der Einfluß von 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosin auf die Synthese des 74K Proteins

Durch die Behandlung von nicht infizierten und SV40 infizierten Zellen mit 1-ß-D-Arabinosylcytosin (ara-C) wird die zelluläre und die virale DNA Replikation reversibel gehemmt (Manteuil and Girard, 1974; Wist et al., 1976). Die Verwendung dieses Inhibitors ermöglicht die Identifizierung der Virusstrukturproteine, da die Transkription der späten Gene nach der DNA Replikation erfolgt. Der Einfluß von Cytosinarabinosid nach SV40 Infektion auf andere Proteine läßt allerdings keine Schlüsse auf den viralen Ursprung der Proteine zu, da sowohl virusinduzierte als auch virusstimulierte Proteine indirekt durch die Hemmung der viralen DNA Synthese beeinflußt werden können. Vor diesem Hintergrund wurde die Beziehung des 74K Proteins und der Strukturproteine untersucht.
Primäre Affennierenzellen erhielten nach Infektion und während der Markierung 20 µg Cytosinarabinosid pro ml Medium. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Infektion geerntet und im Tris-Puffer, pH 9,0, extrahiert. Die Abb. 6 zeigt das Autoradiogramm eines SDS-Polyacrylamidgels mit den extrahierten Proteinen. VP1 und VP3 können 48 Stunden nach SV40 Infektion in den lytisch infizierten primären Zellen dargestellt werden. Durch die Behandlung der Zellen mit Cytosinarabinosid wird die Synthese der Proteine gehemmt. Zu diesem Zeitpunkt ist auch das 74K Protein nachzuweisen: seine Synthese wird ebenfalls durch diesen Hemm-

stoff blockiert (Abb. 6 : C, D).
Veränderungen im Proteinmuster nicht infizierter Kontrollzellen nach Cytosinarabinosid Behandlung wurden nicht festgestellt (Abb. 6 : A, B).

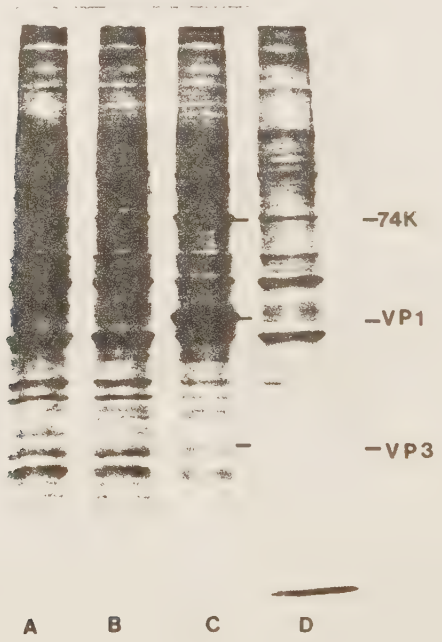


Abb. 6
Autoradiogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels mit pH 9,0 Extrakten nicht infizierter und SV40 infizierter primärer Affennierenzellen. Die Zellen wurden während der Infektion und während des gesamten Zeitraumes nach Infektion bis zur Ernte in einem Medium mit 20 µg Cytosinarabinosid pro ml gehalten.
Die weiteren experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Abb. 3 beschrieben.

A: Extrakt nicht infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung
B: Extrakt nicht infizierter AGMK Zellen, mit Behandlung durch ara-C
C: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung
D: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, mit Behandlung durch ara-C

Untersuchungen, die unter gleichen experimentellen Bedingungen mit permanenten Affennierenzellen durchgeführt wurden, ergaben, daß auch in diesem System die Synthese des 74K Proteins durch ara-C inhibiert wird.
Auch bei der Auftrennung der Proteine aus Kernfraktionen infizierter Zellen konnte nachgewiesen werden, daß Cytosinarabinosid die Synthese der Strukturproteine und des 74K Proteins hemmt.
Die Inhibition der Synthese des Strukturproteins VP2 wurde aus den unter D. I. erläuterten Gründen nicht verfolgt. Es ist jedoch bekannt, daß die Expression aller von der späten Region kodierten Proteine durch Cytosinarabinosid gehemmt wird.

V. Beginn der Synthese des 74K Proteins

Die Untersuchungen zur Inhibition der Synthese des 74K Proteins durch Cytosinarabinosid ließen vermuten, daß die Transkription der späten viralen Gene in einem engen Zusammenhang mit dem 74K Protein steht. Es sollte daher im folgenden geklärt werden, ob das 74K Protein schon in der frühen Phase der lytischen Infektion synthetisiert wird. Zum anderen wurde die Möglichkeit einer Vorläuferbeziehung des 74K Proteins zu den Virusstrukturproteinen untersucht. Um den Beginn der Synthese des 74K Proteins festzustellen, wurden SV40 infizierte Zellen im Abstand von jeweils 2 Stunden mit ^{35}S-Methionin markiert. Danach wurden die Zellen geerntet und im Tris-Puffer, pH 9,0, extrahiert. Die Proteinsynthese infizierter CV-1 Zellen wurde bis zur fünfzigsten Stunde nach Infektion verfolgt. Die Proteine wurden in der SDS-Gelelektrophorese getrennt.
Die in Abb. 7 dargestellte Kinetik zeigt die zu verschiedenen Zeitpunkten extrahierten Proteine. Schon 10 Stunden nach Infektion beginnt die Synthese des VP1, das 74K Protein ist etwa 2 bis 3 Stunden später nachzuweisen. Die Bande unterhalb des VP1 entspricht dem Aktinprotein, die Syntheserate dieses Proteins ist im Verlauf der Infektion konstant. Die Tatsache, daß das VP1 früher synthetisiert wird als das 74K Protein, schließt die Möglichkeit einer Vorläuferbeziehung aus.

Abb. 7

Zeitlicher Verlauf der Proteinsynthese in SV40 infizierten CV-1 Zellen.

Infizierte Zellen wurden im Abstand von jeweils zwei Stunden mit ^{35}S-Methionin (400 µCi/5x10^6 Zellen) markiert. Wie unter Material und Methoden beschrieben, wurden die Zellen nach der radioaktiven Markierung aufgearbeitet.

Links auf dem Autoradiogramm des 10%igen SDS-Gels sind die Proteine infizierter Zellen dargestellt, die von der 0.- 2.h.p.i. markiert worden waren, die Proteine rechts auf dem Autoradiogramm wurden 50 h.p.i. extrahiert.

Dieser Versuch erlaubt allerdings keine exakte Bestimmung, um den Beginn der Synthese des 74K Proteins festzustellen, da sehr geringe Mengen Protein auch durch längeres Exponieren der Röntgenfilme nicht unbedingt nachgewiesen werden können. Die nachfolgenden Experimente zeigen jedoch, daß zu frühen Zeitpunkten nach Infektion die Tumorantigene, die im geringeren Maße synthetisiert werden als die Strukturproteine, durch Immunpräzipitationen nachgewiesen werden konnten.
Entsprechende Versuche mit Antiseren, die gegen die Strukturproteine gerichtet waren, werden im folgenden Teil der Arbeit geschildert.

VI. Immunologische Charakterisierung des 74K Proteins

Um eine immunologische Verwandtschaft der Virusproteine zum 74K Protein festzustellen, wurden mit verschiedenen Antiseren Immunpräzipitationen nach der von Kessler (1975) beschriebenen Technik durchgeführt.
Durch Inkubation von radioaktiv markierten Proteinen mit Antiseren werden Antigen-Antikörperkomplexe gebildet, die nach Zugabe von Staphylokokken an das Zellwandprotein A des Bakteriums gebunden werden. Nach der Auftrennung der Komplexe in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können die immunpräzipitierten Proteine dargestellt werden.
Als Antigenquellen für die Präzipitationen dienten Extrakte von SV40 transformierten und SV40 lytisch infizierten Zellen. Sie wurden wie unter C. III. beschrieben hergestellt.
Zum Nachweis viruskodierter Proteine wurden in den Experimenten folgende Antiseren verwendet:

1. Kaninchen Anti VP1-Serum
2. Ziege Anti SV40-Serum
3. Hamster Anti SV40-Tumor-Serum
4. Meerschweinchen Anti VP3-Serum

Bei den durchgeführten immunologischen Versuchen wurden zur Kontrolle Seren mitgeführt, die von nicht immunisierten, gesunden Tieren stammten. Auf eine Vorabsorption der Seren mit nicht markierten Kontrollzellen wurde verzichtet, da durch diesen Vorgang zelluläre Proteine, die physikalisch mit den Virusproteinen assoziiert sind, präzipitiert werden können. Diese Komplexe werden dann in der anschließenden Präzipitation durch das Antiserum nicht erfaßt. Auch die Eliminierung von unspezifisch reagierenden Proteinen aus den Extrakten infizierter oder transformierter Zellen wurde nicht durchgeführt.
Aus pH 9,0 Extrakten radioaktiv markierter SV40 infizierter primärer Nierenzellen wurde mit dem Kaninchenserum das VP1 und das 74K Protein präzipitiert. Zusätzlich wurde mit diesem gegen VP1 gerichteten Antiserum ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 83.000 Daltons (83K Protein) immunpräzipitiert (Abb. 8 : G). Diese Proteine wurden in Extrakten nicht infizierter Zellen oder in Extrakten infizierter Zellen, die mit Cytosinarabinosid behandelt worden waren, nicht nachgewiesen (Abb. 8 : D, E, H, I). Die Bande des VP1 ist im Kontrollpräzipitat schwach zu erkennen (Abb. 8 : F). Dies beruht wahrscheinlich auf einer unspezifischen Aggregation des Strukturproteins mit dem Protein A von Styphylococcus aureus. Eine Antikörperqualität des Kontrollserums gegen VP1 konnte weder durch die Immunfluoreszenz noch durch die Immunosorbents Technik festgestellt werden. Diese Methoden sind im Teil C. III. der Arbeit beschrieben.

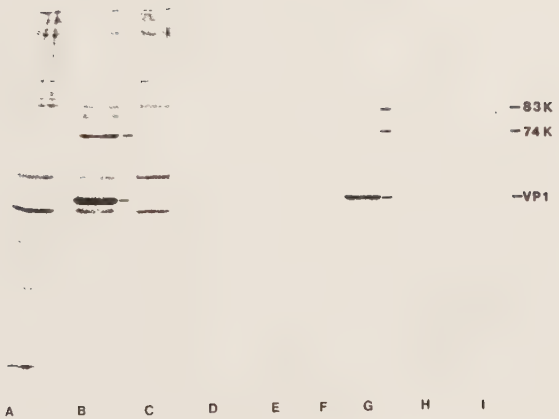


Abb. 8

Fluorogramm mit Immunpräzipitaten aus pH 9,0 Extrakten von SV40 infizierten primären AGMK Zellen, die von der 36. - 48. h.p.i. mit ^{35}S-Methionin markiert wurden. Die Behandlung der Zellen mit Cytosinarabinosid wurde im methodischen Teil der Arbeit beschrieben. Nach Extraktion der Zellen wurden die Immunpräzipitationen nach der Methode von Kessler mit Kaninchen Anti VP1-Seren durchgeführt.

A: Extrakt nicht infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung
B: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung
C: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, mit Behandlung durch ara-C
D: Extrakt nicht infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung, Kontrollserum
E: Extrakt nicht infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung, Anti VP1-Serum
F: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung, Kontrollserum
G: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, ohne Behandlung, Anti VP1-Serum
H: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, mit Behandlung durch ara-C, Kontrollserum
I: Extrakt SV40 infizierter AGMK Zellen, mit Behandlung durch ara-C, Anti VP1-Serum

Mäuseseren, die nach Injektion von gereinigtem VP1 gewonnen wurden, präzipitierten in einem parallel durchgeführten Experiment ebenfalls die Proteine 83K, 74K und VP1. Die Proteine konnten auch durch das Ziegen Anti SV40-Serum präzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Aus Extrakten SV40 transformierter Zellen konnten mit diesen Seren keine der oben beschriebenen Proteine präzipitiert werden.
Seren von Hamstern, die durch Inokulation von SV40 transformierten H 65/90B Zellen Tumore entwickeln, besitzen hohe Antikörpertiter gegen T-Antigen und t-Antigen. Mit diesen Hamster Anti T-Seren wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, um eine mögliche Beziehung der Frühproteine des Virus zum 74K Protein aufzuzeigen.
Aus Extrakten infizierter Zellen wurden mit dem Anti T-Serum fünf Polypeptide präzipitiert, die Molekulargewichte von 88K, 82-80K, 78K, 74K und 48K aufwiesen (Abb. 9 : E,F). Die Proteine wurden nicht aus Kontrollzellen präzipitiert. Um diese Proteine zu identifizieren, wurden Immunpräzipitationen mit Extrakten aus SV40 infizierten Zellen, die mit Cytosinarabinosid behandelt waren, durchgeführt. Es wurde das gleiche Serum verwendet. Die Proteine mit den Molekulargewichten 88K, 82-80K und 78K konnten aus den Extrakten behandelter Zellen mit dem Hamster Anti T-Serum präzipitiert werden (Abb. 9 : H, I). Bei den präzipitierten Proteinen handelt es sich um die verschiedenen Formen des T-Antigens. Dieses Ergebnis stimmt mit Befunden anderer Arbeitsgruppen überein (Weil, 1976; Gurney et al., 1980; Fanning and Burger, 1981). Da die Synthese des 74K Proteins und des VP1 durch Cytosinarabinosid blockiert wird, wurden die Proteine in diesen Präzipitaten nicht nachgewiesen (Abb. 9 : H, I).
Die Präzipitation des 74K Proteins und des VP1 durch das Hamster Anti T-Serum beruht entweder auf die oben erwähnte unspezifische Bindung der Proteine mit dem Protein A oder auf einer Assoziation mit dem T-Antigen. Im Falle des Polyomavirus konnte gezeigt werden, daß ein gegen T-Antigen gerichteter monoklonaler Antikörper auch das Strukturprotein VP1 in stöchimetrischer Menge präzipitiert.

Abb. 9

Fluorogramm mit Immunpräzipitaten aus pH 9,0 Extrakten von SV40 infizierten CV-1 Zellen. Markierung und Extraktion siehe Legende zu Abb. 8. Zur Immunpräzipitation wurden Hamster Anti T-Seren verwendet. Anti T-Serum I wurde von Prof.Dr.G.Walter erhalten. Anti T-Serum II wurde wie unter Material und Methoden beschrieben hergestellt.

A: Extrakt nicht infizierter CV-1 Zellen, Kontrollserum
B: Extrakt nicht infizierter CV-1 Zellen, Anti T-Serum I
C: Extrakt nicht infizierter CV-1 Zellen, Anti T-Serum II
D: Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, ohne Behandlung, Kontrollserum
E: Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, ohne Behandlung, Anti T-Serum I
F: Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, ohne Behandlung, Anti T-Serum II
G: Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, mit Behandlung durch ara-C, Kontrollserum
H: Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, mit Behandlung durch ara-C, Anti T-Serum I
I: Extrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, mit Behandlung durch ara-C, Anti T-Serum II

Es fällt auf, daß die T-Antigenmoleküle in Extrakten, die mit Cytosinarabinosid behandelt worden waren, im geringeren Maße synthetisiert werden als in unbehandelten Zellen.
Da durch Cytosinarabinosid die DNA Synthese blockiert wird, liegen entsprechend weniger Moleküle vor, an denen die Transkription der frühen mRNAs stattfindet; daher werden in Cytosinarabinosid behandelten Zellen weniger frühe virale Proteine synthetisiert als in unbehandelten Zellen.
Das t-Antigen konnte in dem geschilderten Experiment nicht nachgewiesen werden. Es wurde jedoch aus Extrakten transformierter Zellen mit dem Hamster Anti T-Serum präzipitiert; es wanderte mit einer Mobilität, die einem Molekulargewicht von 17.000 Daltons entspricht.
Aus den Kernextrakten infizierter permanenter Nierenzellen konnten mit dem Meerschweinchen Anti VP3-Serum die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 präzipitiert werden. Auch das 83K Protein und das 74K Protein wurden in diesem Präzipitat nachgewiesen (Abb. 10 : B).

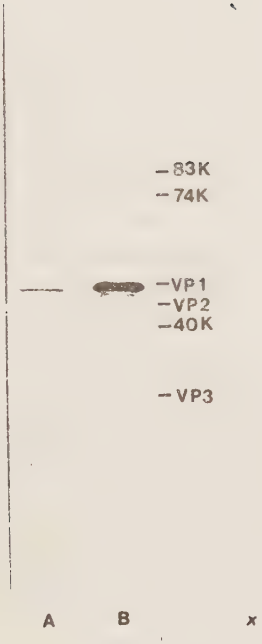


Abb. 10

Fluorogramm des Proteinmusters aus Kernextrakten SV40 infizierter CV-1 Zellen nach Immunpräzipitation mit Meerschweinchen Anti VP3-Serum. Markierung der Zellen siehe Legende zu Abb. 5. Die Isolierung und Extraktion der Kerne wurde wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

A: Kernextrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, Kontrollserum

B: Kernextrakt SV40 infizierter CV-1 Zellen, Anti VP3-Serum

Der Frage, ob das 74K Protein spezifisch mit dem gegen VP3 oder VP1 gerichteten Antikörper reagiert, oder ob das 74K Protein durch Komplexierung mit den Strukturproteinen angereichert wird, wurde mit Hilfe der Methode des "western blot" nachgegangen. Das Prinzip dieser Technik ist folgendes: Zellextrakte werden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf elektrophoretischem Wege aus dem Gel auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Da die Proteine nicht in den Filter einwandern,sind sie nun für immunologische Reaktionen leicht zugänglich. Antikörper,die gegen bestimmte Proteine gerichtet sind,binden an die korrespondierende Bande. Im nächsten Schritt wird ein ^{125}J-markierter anti-Antikörper angelagert. Durch Autoradiographie kann so der Komplex sichtbar gemacht werden. Mit leichten Modifikationen wurde nach der Methode von Towbin, Staehelin und Gordon (1979) vorgegangen. Da jedoch durch diese Technik, auch bei wiederholten Versuchen, keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden konnten, wurden die Experimente abgebrochen. Es gelang jedoch durch die nachfolgenden biochemischen Untersuchungen, Hinweise auf die Beantwortung dieser Frage zu erhalten.

VII. Untersuchungen zum Nachweis des 74K Proteins in gereinigten SV40 Viren

Durch das folgende Experiment sollte festgestellt werden, ob das 74K Protein Bestandteil des SV40 Virus ist. Zu diesem Zweck wurden permanente Affennierenzellen mit niedrigen Virusdosen infiziert. Die Zellen wurden 3 Tage nach der Infektion bis zur Ernte der Kulturen mit ^{35}S-Methionin markiert. Das Virus wurde durch die Fällung mit Polyethylenglycol konzentriert und in einem ersten Schritt durch CsCl-Dichtegradienten Zentrifugation gereinigt. Die leeren und die vollen Partikel wurden durch Fraktionierung des CsCl-Gradienten gewonnen. Die leeren Kapside wurden in der SDS-PAGE analysiert. Die aufgetrennten Proteine

wurden unter anderem zur Herstellung von Antiseren verwendet. Zur weiteren Reinigung wurden die Viren durch Zentrifugation durch einen 5 - 30%igen Sucrosegradienten auf ein CsCl Polster bandiert.
Die Abb. 11 zeigt die Analyse der Fraktionen des Sucrosegradienten. Die Fraktion Nr. 3 des Gradienten entspricht der Spur 3 des SDS-Gels, sie enthält das gereinigte Virus. Zusätzlich zu den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 wurde ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 40K aufgetrennt. Nachfolgende Analysen ergaben, daß es sich bei diesem Protein um ein Degradationsprodukt des VP1 handelt. Die zellulären Histone, die mit der Virus DNA assoziiert sind, konnten nicht erfaßt werden. Sie wanderten bei der verwendeten Acrylamidkonzentration aus dem Gel. Die Proteine mit den Molekulargewichten 125K und 95K stellen wahrscheinlich zelluläre Kontaminanten dar.
Das 74K Protein konnte nicht nachgewiesen werden. Auch in Immunpräzipitaten aus dieser Fraktion mit Kaninchen Anti VP1-Serum wurde das 74K Protein nicht gefunden. Es wurde daher geschlossen, daß das 74K Protein kein Bestandteil intakter SV40 Partikel ist.
Bei der Analyse der über CsCl-Zentrifugation gereinigten leeren Kapside durch die SDS-PAGE konnte ebenfalls das 74K Protein nicht identifiziert werden.

Abb. 11

Autoradiogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels mit Proteinen aus Fraktionen des 5 - 30%igen Sucrosegradienten zur Isolierung von SV40.
Die Bedingungen zur Reinigung des Virus wurden im Teil C. I. 8. der Arbeit beschrieben.
Die von 1 bis 15 nummerierten Spuren des Gels entsprechen den Fraktionen des Gradienten. Fraktion 1 des Gradienten enthielt die höchste Sucrosekonzentration, Fraktion 15 enthielt die niedrigste Sucrosekonzentration.

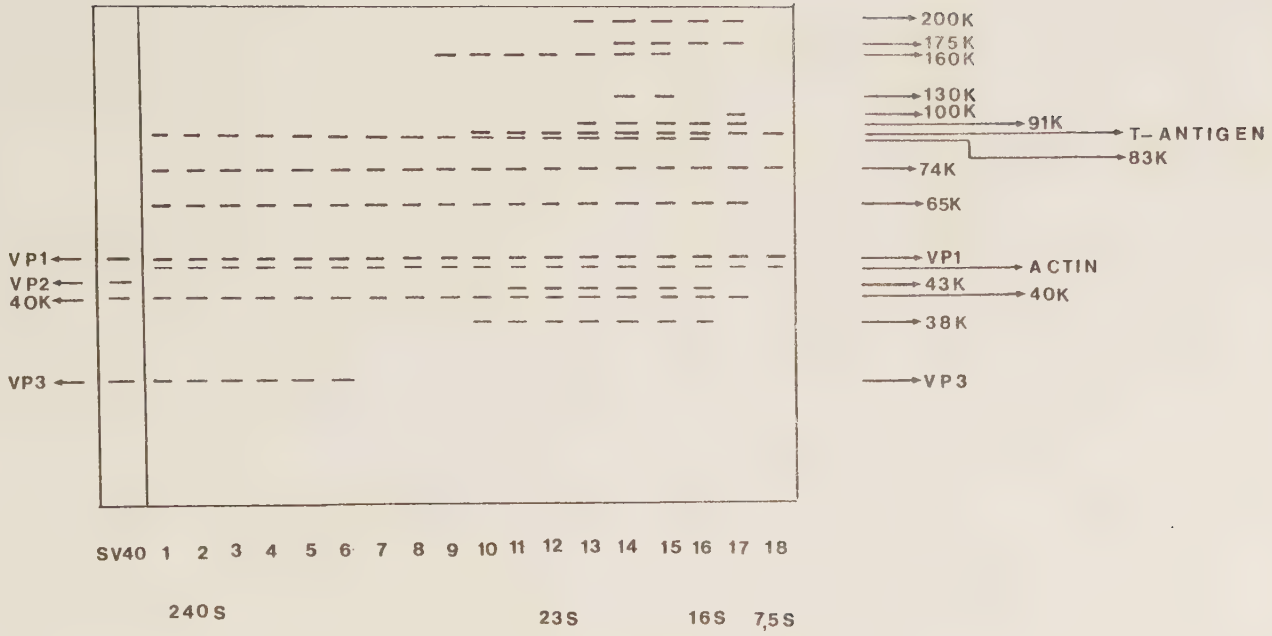
Wie die immunologischen Untersuchungen zeigten, wird das 74K Protein durch Antiseren, die gegen VP1 und VP3 gerichtet sind, präzipitiert. Die Vermutung lag nahe, daß das 74K Protein Antigendeterminanten beider Strukturproteine besitzt. Es wurde nun versucht, die aus dem Virus isolierten, über SDS-Gele gereinigten Proteine VP1 und VP3 zu komplexieren, um ein entsprechendes Protein zu rekonstituieren. Dazu wurden die isolierten radioaktiv markierten Strukturproteine VP1 und VP3 gegen Tris-Puffer, pH 9,0, dialysiert. Etwa gleiche Mengen der Proteine wurden gemischt und für 30 Minuten bei 4°C bzw. 37°C entweder mit Tris-Puffer, pH 9,0, oder mit pH 9,0 Extrakt nicht infizierter und nicht markierter CV-1 Zellen, oder mit pH 9,0 Extrakt SV40 infizierter und nicht markierter CV-1 Zellen inkubiert. Die jeweiligen Mischungen wurden entsprechend der pH 9,0 Extraktion dreimal gefroren und getaut. Anschließend wurden die Lösungen für 30 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden für die Analysen verwendet. In der SDS-Gelelektrophorese konnten VP1 und VP3 identifiziert werden, jedoch wurde unter diesen Bedingungen keine Komplexierung der Moleküle beobachtet.
Parallel zu dem hier geschilderten Experiment wurde gereinigtes Virus unter den gleichen Bedingungen behandelt. Auch durch diese Versuchsanordnung konnte das 74K Protein bei der anschließenden Elektrophorese nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

VIII. Immunpräzipitation von Proteinen aus SV40 infizierten primären Affennierenzellen nach der Trennung im Sucrosegradienten

Durch Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation können Polymere aufgetrennt werden,ohne ihre native Struktur zu zerstören. Daher eignet sich diese Methode, um Proteine zu erfassen, die mit dem Strukturprotein VP1 oder dem 74K Protein in komplexierter Form vorliegen. Die assoziierten Proteine können durch anschließende Immunpräzipitation mit Anti-VP1-Seren copräzipitiert werden.
Primäre AGMK Zellen wurden von der 36. - 48. h.p.i. mit

^{35}S-Methionin markiert. Die Proteine wurden durch Extraktion im Tris-Puffer, pH 9,0, gewonnen. 150 µl des Extraktes wurden auf einen vorgeformten 5 - 30%igen Sucrosegradienten im selben Puffer geschichtet und 15 Stunden im SW41 Rotor bei 29.000 rpm zentrifugiert. Der Gradient wurde abgetropft, und die gewonnenen Fraktionen wurden mit Kaninchen Anti VP1-Serum versetzt. Durch Zugabe der Staphylokokkensuspension wurden die Proteine präzipitiert. Die Analyse der immungefällten Proteine in der Gelelektrophorese ist in der Abb. 12 schematisch dargestellt.
Zur Identifizierung der Proteine wurde gereinigtes SV40 sowohl im Gradienten als auch in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese parallel mitgeführt. Die Molekulargewichte wurden anhand einer erstellten Eichkurve ermittelt.In allen Fraktionen des Gradienten wurde das VP1 und das 74K Protein gefunden. Die nativen Molekulargewichte der beiden Moleküle konnten daher nicht abgeschätzt werden. Jedoch konnten andere Proteine durch die Zentrifugation im Sucrosegradienten getrennt werden. Die Verteilung der Proteine in bestimmte Fraktionen deutet auf verschiedene, mit dem VP1 komplexierte Strukturen hin. So wurden in den Fraktionen 1 bis 6 (ca. 250-120S) die folgenden Proteine copräzipitiert: 83K, 74K, 65K, 44K (Aktin) und VP3. Die Polypeptidmuster der Fraktionen 8 bis 16 (ca. 120-16S) sind komplizierter. Es konnten zusätzlich Proteinspezies mit den Molekulargewichten 200K, 175K, 160K, 130K, 100K, 91K, 88K (T-Antigen), 43K und 38K nachgewiesen werden. VP3 wurde in diesen Fraktionen nicht gefunden (Abb. 12).
Das Ergebnis des Versuches zeigt, daß unterschiedliche Proteine durch die Immunpräzipitation zusammen mit dem VP1 und dem 74K Protein angereichert werden können; jedoch ist zu beachten, daß die gefundenen "Komplexe" nicht biologischen Strukturen entsprechen müssen.
Diese Resultate werden im Abschnitt "Diskussion" im Zusammenhang mit neueren Befunden anderer Arbeitsgruppen besprochen.

Abb. 12


200K
175K
160K
130K
100K
91K
T-ANTIGEN
83K
74K
65K
VP1
ACTIN
43K
40K
38K
VP3
VP1
VP2
40K
VP3
SV40 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
240S
23S
16S
7,5S

Legende zu Abb. 12

Schematisierte Darstellung eines Fluorogramms mit Immunpräzipitation aus Fraktionen eines 5 - 30%igen Sucrosegradienten. Als Ausgangsmaterial für die Trennung durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation diente pH 9,0 Extrakt aus SV40 infizierten primären AGMK Zellen. Die Herstellung des Gradienten und die Durchführung der Zentrifugation wurden im methodischen Teil der Arbeit beschrieben. Zur Immunpräzipitation mit Kaninchen Anti VP1-Serum wurden 0,2 ml der jeweiligen Fraktion verwendet. Die Immunpräzipitate wurden in einem 10%igem SDS-Acrylamidgel aufgetrennt.

IX. Zwei-dimensionale Peptidanalysen der SV40 Strukturproteine und des 74K Proteins

Zwei-dimensionale Peptidanalysen ermöglichen, Informationen über die strukturelle Beziehung von Proteinen zu erhalten. Durch Markierung der Proteine mit verschiedenen radioaktiven Aminosäuren können durch diese Methode bestimmte Peptide identifziert und einander zugeordnet werden.
Zur Erklärung der ähnlichen biochemischen Eigenschaften des 74K Proteins und des VP1 in den beschriebenen Experimenten war es wichtig festzustellen, ob dies in einer ähnlichen Struktur der Moleküle begründet ist. In den nachfolgenden Versuchen sollte auch die Beziehung des 74K Proteins zum 83K Protein und zum T-Antigen aufgezeigt werden.

1. Peptidanalysen ^{35}S-Methionin markierter Proteine

SV40 infizierte CV-1 Zellen wurden 36 Stunden nach Infektion mit ^{35}S-Methionin markiert. Nach der Extraktion wurden die Proteine durch präparative Immunpräzipitation mit Ziegen Anti SV40-Serum gefällt. Die Immunkomplexe wurden in 2 mm dicken SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Autoradiographie identifiziert und aus den Gelen herausgeschnitten. Die so gereinigten Proteine, das 83K, das 74K und das VP1 wurden aus den Gelstreifen isoliert. Aus den Eluaten wurden die Proteine durch Trichloressigsäure präzipitiert. Die anschließende Oxidation, der tryptische Verdau und die zwei-dimensionale Auftrennung wurden im Teil "Material und Methoden" ausführlich beschrieben. Zur Reinigung des T-Antigens wurden die Extrakte mit Hamster Anti T-Serum präzipitiert. Zusätzlich wurden die Strukturproteine von SV40 aus gereinigten ^{35}S-Methionin markierten Viren durch präparative SDS-Gelelektrophorese isoliert.
Zum Vergleich sind die ^{35}S-Methionin markierten tryptischen Peptide der Proteine des VP1, 74K Proteins und des VP3 in Abb. 13 dargestellt.

Abb. 13

Legende zu Abb. 13

Autoradiogramme mit den zwei-dimensionalen Peptidmustern ^{35}S-markierter Proteine.

Die Reinigung und der tryptische Verdau der Peptide wurde wie unter C. V. 4. beschrieben durchgeführt. Die Trennung der Peptide in der ersten Dimension durch Elektrophorese bei pH 4,7 erfolgte von links nach rechts. Zur Auftrennung in der zweiten Dimension wurde eine aufsteigende Chromatographie bei pH 5,2 durchgeführt. Die Menge der auf die Platten aufgetragenen Radioaktivität und die Expositionszeiten waren wie folgt:

A: VP1, gereinigt durch Immunpräzipitation mit Ziegen Anti SV40-Serum, 70.000 cpm, Exposition 4 Tage

B: VP1 aus gereinigtem SV40 Virus, 64.000 cpm, Exposition 3 Tage

C: 74K Protein, gereinigt durch Immunpräzipitation, 60.000 cpm, Exposition 4 Tage

D: VP3 aus gereinigtem SV40 Virus, 5.000 cpm, Exposition 14 Tage

Die Muster der getrennten Peptide des VP1, das durch Immunpräzipitation aus SV40 infizierten CV-1 Zellen isoliert wurde, und das Muster des VP1, das aus dem Virus stammte, sind sehr ähnlich (Abb. 13 : A, B).
Die Proteine besitzen die gleiche Anzahl markierter tryptischer Peptide. Geringe Unterschiede in der Intensität zweier Peptide wurde festgestellt.
Der Vergleich der VP1 Moleküle mit dem 74K Protein ergab, daß das VP1 gleiche methioninenthaltende Peptide wie das 74K Protein aufweist (Abb. 13 : A, B, C). Jedoch sind zusätzlich im Muster des 74K Proteins zwei Peptide zu finden, die mit den Peptiden des VP3 comigrieren (Abb. 13 : C, D). Diese Peptide sind in der Abbildung mit "Sternchen" gekennzeichnet.
Um festzustellen, ob es sich um die gleichen Peptide handelt, wurden diese Peptide aus den Dünnschichtplatten eluiert und nochmals zwei-dimensional aufgetrennt.
Die Abb. 14 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.
Die comigrierenden Peptide wanderten identisch.
Beim Vergleich der oben beschriebenen Proteine mit dem durch das gleiche Antiserum gereinigten 83K Protein wurde festgestellt, daß alle tryptischen Peptide des VP1 auch im Muster des 83K Proteins enthalten sind. Zusätzlich gefundene, schwach markierte Peptide des 83K Protein konnten allerdings den Peptiden des VP3 oder dem 74K Protein nicht eindeutig zugeordnet werden. Es ist anzunehmen, daß diese Peptide von Proteinen stammen, die bei der Reinigung durch die Immunpräzipitation und der anschließenden Elektrophorese nicht getrennt werden konnten (Daten nicht gezeigt).
Die Peptidmuster der T-Antigen Spezies 88K, 82-80K und 78K zeigten untereinander große Ähnlichkeit; sie waren jedoch verschieden zu den Mustern des VP1, des VP3 und des 74K Proteins (Daten nicht gezeigt).

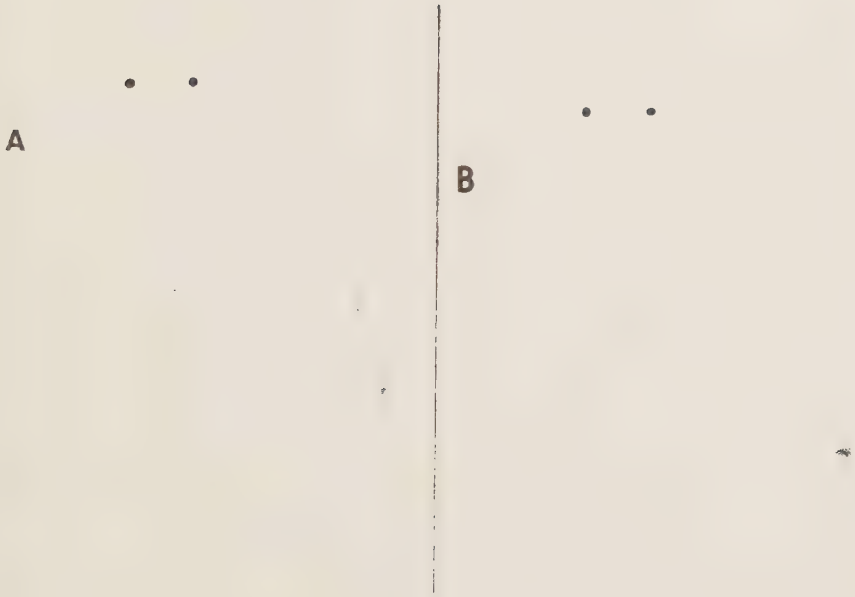


Abb. 14
Autoradiogramme der comigrierenden tryptischen Peptide des 74K Proteins und des VP3.
Die eluierten Peptide wurden nochmals durch Elektrophorese und Chromatographie getrennt.

A: Peptide des VP3, 700 cpm, Exposition 22 Tage
B: Die Mischung der Peptide des VP3 und des 74K Proteins, jeweils 400 cpm, Exposition 22 Tage

2. Peptidanalysen ^{3}H-Serin markierter Proteine

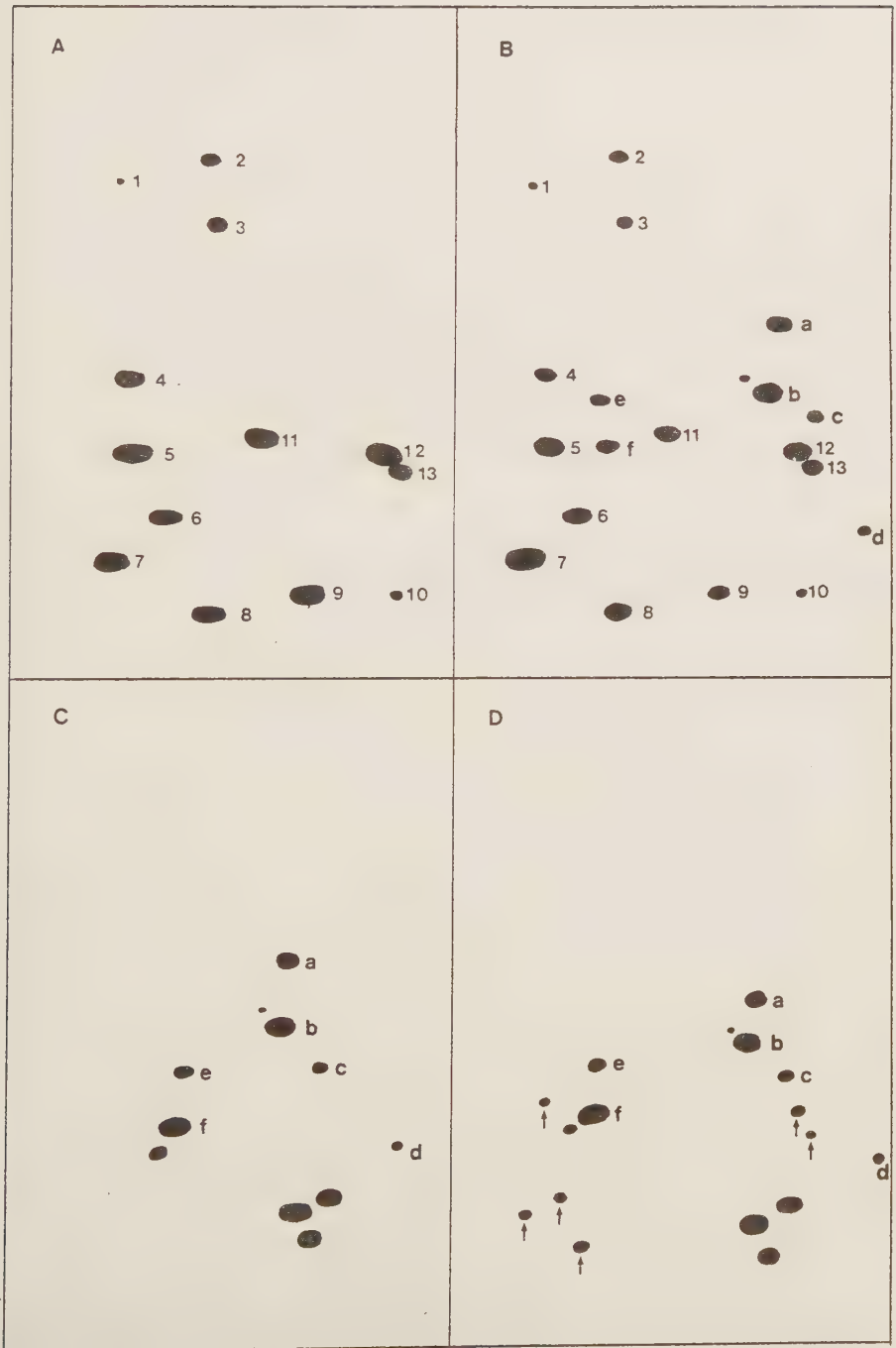
Die Ergebnisse der Peptidanalysen ^{35}S-Methionin markierter Proteine sollten durch die Markierung mit ^{3}H-Serin bestätigt werden. Die folgenden Versuche erlauben, eine genauere Aussage über die Beziehung der Proteine zu machen, da durch diese Markierung ein komplexeres Muster der Peptide erwartet werden konnte. Das tryptische Peptidmuster des ^{35}S-Methionin markierten VP2 unterscheidet sich nur durch ein einziges zusätzliches Peptid von dem des VP3 (Hunter, 1979). Eine genauere Untersuchung der Moleküle ist daher notwendig. Durch die Markierung mit ^{3}H-Serin können die Proteine besser unterschieden werden. Daher kann bei dem Vergleich der Peptide mit dem 74K Protein festgestellt werden, ob die Peptide des VP2 oder des VP3 in dem Muster des 74K Proteins enthalten sind.
Es wird vermutet, daß VP2 und VP3 gleiche Carboxy-terminale Enden besitzen (Rozenblatt et al., 1976; Cole et al., 1977). Wie aus der von Fiers (1978) bestimmten DNA Sequenz hervorgeht, ist dann die C-terminale Aminosäure beider Proteine Serin. Da die vorhergehende Aminosäure Arginin ist, kann durch den tryptischen Verdau der Proteine Serin freigesetzt werden. Es wurde versucht, das "freie" Serin in den Peptidmustern der Proteine nachzuweisen. Zur Identifizierung wurde ^{14}C-Serin separat auf einer Dünnschichtplatte aufgetrennt. Darüber hinaus wurde versucht, die Carboxy-Termini des VP2, des VP3 und des 74K Proteins mit Hilfe der Carboxypeptidase Y zu bestimmen.
Die Markierung der infizierten Zellen mit ^{3}H-Serin wurde im Teil "Material und Methoden" beschrieben. Die Reinigung durch die Immunpräzipitation mit Anti SV40-Serum wurde analog zu den oben beschriebenen Experimenten durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, daß die Versuchsbedingungen beim Verdau und der anschließenden zwei-dimensionalen Auftrennung exakt den Bedingungen entsprachen, wie sie für die Analyse der ^{35}S-Methionin markierten Proteine beschrieben wurden. Die Abb. 15 zeigt die Peptidmuster der ^{3}H-Serin markierten Strukturproteine VP1, VP2, VP3 und die des 74K Proteins. Die von 1 bis 13 numerierten Peptide des VP1 konn-

ten beim Vergleich auch in dem Peptidmuster des 74K Proteins identifiziert werden. Sie wurden ebenfalls von 1 bis 13 numeriert (Abb. 15 : A, B und Abb. 16 : A, B). Durch Mischung der tryptischen Peptide des VP1 und des 74K Proteins und der anschließenden gleichzeitigen Auftrennung (Mischung VP1 - 74K Protein) konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Wie theoretisch zu erwarten war, zeigten die Peptidmuster von VP2 und VP3 eine teilweise Übereinstimmung (Hunter, 1979). Die mit Pfeilen markierten Peptide in dem Muster des VP2 (Abb. 15 und 16 : D) konnten weder in den Peptidmustern des VP3 (Abb. 15 und 16 : C) noch in dem Muster des 74K Proteins (Abb. 15 und 16: B) gefunden werden. Der Vergleich der tryptischen Peptide des 74K Proteins mit denen des VP3 zeigt, daß die mit Buchstaben bezeichneten Peptide sehr ähnlich wandern (Abb. 15 und 16 : B, C). Auch diese Befunde konnten durch das Mischungsexperiment (Mischung 74K Protein - VP3) bestätigt werden. Die Peptide a bis f wurden auch in dem Peptidmuster des VP2 identifiziert (Abb. 15 und 16 : B, D). Das durch Trypsin freigesetzte Serin am C-Terminus des VP2 und des VP3 konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Jedoch wurde unterhalb des mit "f" markierten Peptids in den Mustern des VP2 und des VP3 eine Schwärzung des Filmes festgestellt: in diesem Bereich wanderte das parallel mitgeführte ^{14}C markierte Serin. Eine identisch wandernde Aminosäure konnte in den Peptidmustern des 74K Proteins nicht nachgewiesen werden. Da die Bestimmung der COOH-Termini durch enzymatischen Verdau mit der Carboxypeptidase Y mißlang, kann die Frage gleicher Carboxy-terminaler Enden des 74K Proteins nicht eindeutig beantwortet werden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle mit Methionin und mit Serin markierten Peptide des VP1 in den Mustern des 74K Proteins identifiziert werden konnten. Der Vergleich mit den Strukturproteinen VP2 und VP3 ergab weiterhin, daß 5 Serin markierte Peptide, a bis f, mit 5 Peptiden des 74K Proteins gleichartig wanderten. 6 Serin Peptide des VP3 und 10 Serin Peptide des VP2 konnten nicht im Peptidmuster des 74K Proteins nachgewiesen werden.

Abb. 15

A
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
a
b
c
d
e
f
C
a
b
c
d
e
f
D
a
b
c
d
e
f

Abb. 16


A
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
B
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
a
b
c
d
e
f
C
a
b
c
d
e
f
D
a
b
c
d
e
f

Legende zu Abb. 15

Fluorogramme tryptischer Peptidmuster ^{3}H-Serin markierter Proteine. Isolierung und Behandlung der Proteine wurden unter C. V. 3. und C. V. 4. beschrieben.

A: VP1, gereinigt durch Immunpräzipitation mit Ziegen Anti SV40-Serum, 30.000 cpm, Exposition 17 Tage
B: 74K Protein, gereinigt durch Immunpräzipitation mit Ziegen Anti SV40-Serum, 6.000 cpm, Exposition 8 Wochen
C: VP3, gereinigt durch Immunpräzipitation mit Ziegen Anti SV40-Serum, 30.000 cpm, Exposition 17 Tage
D: VP2, gereinigt durch Immunpräzipitation mit Ziegen Anti SV40-Serum, 5.400 cpm, Exposition 8 Wochen

Legende zu Abb. 16

Schematische Darstellung der Fluorogramme der Abb. 15

3. Zuordnung der Peptide zur Aminosäuresequenz durch den Vergleich tryptischer methionin- und serinenthaltender Peptide

Die durchgeführten Peptidanalysen nach Markierung der Proteine mit ^{35}S-Methionin und ^{3}H-Serin zeigten, daß das 74K Protein sowohl gemeinsame Peptide mit dem VP1 als auch mit dem VP3 bzw. VP2 besitzt. Durch den Vergleich der Peptidmuster können die Peptide, die sowohl Methionin als auch Serin enthalten, identifiziert und der Aminosäuresequenz zugeordnet werden. Die schematische Wiedergabe der Methionin und Serin markierten Peptidmuster des VP1 und des VP3 sind in Abb. 17 dargestellt. Die Peptide 2, 3, 4, 6 und 9 des VP1 enthalten Methionin und Serin (Abb. 17 : A, B). Die Peptide a und b des VP3 enthalten ebenfalls beide Aminosäuren (Abb. 17 : C, D).

Im Muster des 74K Proteins konnten die Peptide des VP1, die Methionin und Serin enthalten identifiziert werden. Sie haben folgende Sequenz:

Thr-Gly-Val-Asp-Ser-Phe-Thr-Glu-Val-Glu-Cys-Phe-Leu-Asn-Pro-Gln-Met-Gly-Asn-Pro-Asp-Glu-His-Gln-Lys

Thr-Glu-Val-Ile-Gly-Val-Thr-Ala-Met-Leu-Asn-Leu-His-Ser-Gly-Thr-Gln-Lys

Asn-Ala-Thr-Val-Asp-Ser-Gln-Gln-Met-Asn-Thr-Asp-His-Lys

Val-Asp-Gly-Gln-Pro-Met-Ile-Gly-Met-Ser-Ser-Gln-Val-Glu-Glu-Val-Arg

Durch den Vergleich der Peptidmuster wurde gezeigt, daß 5 Peptide des VP1 beide Aminosäuren enthalten. Theoretisch sind aber nur 4 Peptide zu erwarten; dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Spaltung des Proteins durch das Trypsin zurückzuführen.

Zwei Peptide des VP3 enthalten sowohl Methionin als auch Serin; auch diese Peptide konnten im Muster des 74K Proteins nachgewiesen werden:

Phe-Leu-Glu-Glu-Thr-Thr-Trp-Thr-Val-Ile-Asn-Ala-Pro-Val-Asn-Trp-Tyr-Asn-Ser-Leu-Gln-Asp-Tyr-Tyr-Ser-Thr-Leu-Ser-Pro-Ile-Arg-Pro-Thr-Met-Val-Arg

Thr-Ala-Pro-Gln-Trp-Met-Leu-Pro-Leu-Leu-Leu-Gly-Leu-Tyr-Gly-Ser-Val-Thr-Ser-Ala-Leu-Lys

Anmerkung: In dem oben aufgeführten ersten tryptischen Peptid des VP3 ist Arginin in der Position 31 unterstrichen; Trypsin schneidet wahrscheinlich an dieser Stelle nicht, da die nachfolgende Aminosäure Prolin ist.

Abb. 17

Legende zu Abb. 17

Schematische Darstellung von ^{35}S-Methionin und ^{3}H-Serin markierten Proteinen des VP1 und des VP3. Die Autoradiogramme der methioninenthaltenden Peptide des VP1 und des VP3 wurden in der Abb. 14 gezeigt. Die Fluorogramme der serinenthaltenden Peptide wurden in Abb. 15 vorgestellt.

A: VP1, ^{35}S-Methionin markiert
B: VP1, ^{3}H-Serin markiert
C: VP3, ^{35}S-Methionin markiert
D: VP3, ^{3}H-Serin markiert

4. Zuordnung der Peptide zur Aminosäuresequenz durch das Abschätzen des Wanderungsverhaltens

Die ungefähre Mobilität eines Peptids in der zwei-dimensionalen Auftrennung kann durch die Summierung der Ladungen der einzelnen Aminosäuren und durch die Bestimmung des mittleren Rf-Wertes ermittelt werden. Bei der Abschätzung der Wanderung wurde das Molekulargewicht der Peptide vernachlässigt.
Die errechneten Werte der ^{3}H-Serin markierten tryptischen Peptide des VP3 wurden den Peptiden auf dem Fluorogramm zugeordnet. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Serin markierte tryptische Peptide des VP3	Rf-Werte	Ladung	Bezeichnung der Peptide auf dem Fluorogramm
I	0,23	+ 1,00	nicht bezeichnet
II	0,27	+ 1,00	nicht bezeichnet
III	0,21	+ 1,00	nicht bezeichnet
IV	0,41	+ 1,00	c
V	0,48	+ 1,00	a
VI	0,33	- 0,38	nicht bezeichnet
VII	0,36	- 1,39	nicht bezeichnet
VIII	0,43	+ 0,41	b
IX	0,35	+ 0,33	f
X	0,40	+ 0,08	e
XI	0,45	+ 2,00	d
XII	0,44	- 0,25	nicht bezeichnet

Tabelle 1
Die Folge der Aminosäuren der tryptischen Peptide des VP3 wurde von der Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet. Die Peptide wurden vom COOH-Ende beginnend von I bis XII numeriert. Für jedes tryptische Peptid wurde die Ladung und der Rf-Wert errechnet. Die Werte wurden den in dem Fluorogramm identifizierten Peptiden zugeordnet.
Zur besseren Übersicht sind diese Daten in der Abb. 18 graphisch dargestellt.

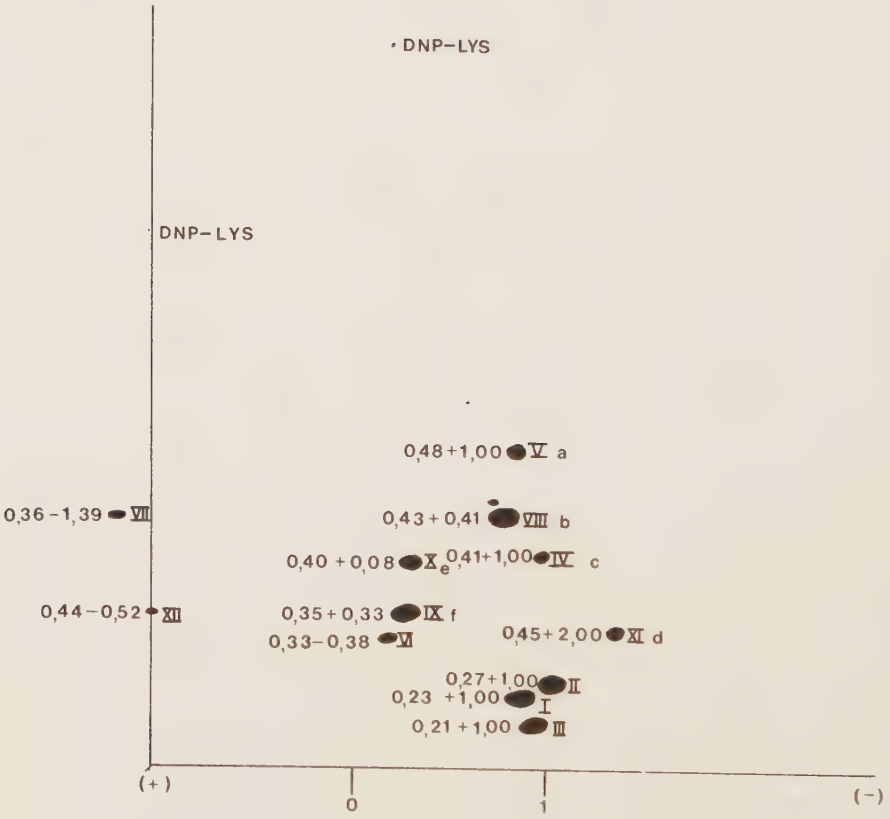


Abb. 18

Schematische Wiedergabe eines Fluorogramms mit den tryptischen ^{3}H-Serin markierten Peptiden des VP3. Neben den bezeichneten Peptiden ist der Rf-Wert und die Ladung der einzelnen Peptide angegeben. DNP-Lysin wurde als neutraler Marker in beiden Dimensionen mitgeführt.

Wie aus der Tabelle 1 und der Abb. 18 hervorgeht, entsprechen die errechneten Mobilitäten näherungsweise den tatsächlich gefundenen Wanderungsstrecken der Peptide. Beim Vergleich der Serin enthaltenden tryptischen Peptidmuster des VP3 und des 74K Proteins fällt auf, daß die Peptide I (0,23/+1,00), II (0,27/+1,00) und III (0,21/+1,00) nicht im Muster des 74K Proteins gefunden wurden. Die Peptide VII (0,36/-1,39) und XII (0,44/-0,25) des VP3 konnten auf Grund ihrer sehr schwachen Markierung im Muster des 74K Proteins nicht sicher nachgewiesen werden.
Auch für die tryptischen Peptide des VP1 wurden die Mobilitäten errechnet. Die ermittelten Werte konnten jedoch nur einigen Peptiden zugeordnet werden. Peptide mit errechneten stark positiven oder stark negativen Ladungen migrierten bei der Elektrophorese wahrscheinlich zu weit zu den jeweiligen Elektroden, um nachgewiesen werden zu können. Zum anderen erschwerten partiell verdaute Peptide die Korrelation der ermittelten Werte zu den Peptiden. Aus der Aminosäuresequenz des VP1 konnten die Spaltstellen des Trypsins nicht genau vorhergesagt werden. Unvollständige Verdauung der Proteine kann bei den durchgeführten Versuchen nicht völlig ausgeschlossen werden. Dieser Effekt führt zu drastischen Änderungen in dem theoretisch zu erwartenden Peptidmuster.
Die Ergebnisse der vorgestellten zwei-dimensionalen Peptidanalysen zeigen, daß das 74K Protein alle tryptischen Peptide des VP1 enthält. Auch im Strukturprotein VP3 wurden Peptide identifiziert, die denen des 74K Proteins entsprechen. Im Peptidmuster des 74K Proteins konnten die Peptide des VP3, die durch Abschätzung ihrer Mobilität dem COOH-Ende zugeordnet wurden, nicht gefunden werden.
In der unten gezeigten Aminosäuresequenz des VP3 und des VP1 sind die mit dem 74K Protein übereinstimmenden tryptischen Peptide gekennzeichnet.

VP1:

NH_2-Ala-Pro-Thr-Lys-Arg-Lys-Gly-Ser-Cys-Pro-Gly-Ala-Ala-
Pro-Lys-Lys-Pro-Lys-Glu-Pro-Val-Glu-Val-Pro-Lys-Leu-Val-
Ile-Lys-Gly-Gly-Ile-Glu-Val-Leu-Gly-Val-Lys-Thr-Gly-Val-
Asp-Ser-Phe-Thr-Glu-Val-Glu-Cys-Phe-Leu-Asn-Pro-Gln-Met-
Gly-Asn-Pro-Asp-Glu-His-Gln-Lys-Gly-Leu-Ser-Lys-Ser-Leu-
Ala-Ala-Glu-Lys-Gln-Phe-Thr-Asp-Asp-Ser-Pro-Asp-Lys-Glu-
Gln-Leu-Pro-Cys-Tyr-Ser-Val-Ala-Arg-Ile-Pro-Leu-Pro-Asn-
Leu-Asn-Glu-Asp-Leu-Thr-Cys-Gly-Asn-Ile-Leu-Met-Trp-Glu-
Ala-Val-Thr-Val-Lys-Thr-Glu-Val-Ile-Gly-Val-Thr-Ala-Met-
Leu-Asn-Leu-His-Ser-Gly-Thr-Gln-Lys-Thr-His-Glu-Asn-Gly-
Ala-Gly-Lys-Pro-Ile-Gln-Gly-Ser-Asn-Phe-His-Phe-Phe-Ala-
Val-Gly-Gly-Glu-Pro-Leu-Glu-Leu-Gln-Gly-Val-Leu-Ala-Asn-
Thr-Arg-Thr-Lys-Tyr-Pro-Ala-Gln-Thr-Val-Thr-Pro-Lys-Asn-
Ala-Thr-Val-Asp-Ser-Gln-Gln-Met-Asn-Thr-Asp-His-Lys-Ala-
Val-Leu-Asp-Lys-Asp-Asn-Ala-Tyr-Pro-Val-Glu-Cys-Trp-Val-
Pro-Asp-Pro-Ser-Lys-Asn-Glu-Asn-Thr-Arg-Thr-Phe-Gly-Thr-
Tyr-Thr-Gly-Gly-Glu-Asn-Val-Pro-Pro-Val-Leu-His-Ile-Thr-
Asn-Thr-Ala-Thr-Thr-Val-Leu-Leu-Asp-Glu-Gln-Gly-Val-Gly-
Pro-Leu-Cys-Lys-Ala-Asp-Ser-Leu-Tyr-Val-Ser-Ala-Val-Asp-
Ile-Cys-Gly-Leu-Phe-Thr-Asn-Thr-Ser-Gly-Thr-Gln-Gln-Trp-
Lys-Gly-Leu-Pro-Arg-Tyr-Phe-Lys-Ile-Thr-Leu-Arg-Lys-Arg-
Ser-Val-Lys-Asn-Pro-Tyr-Pro-Ile-Ser-Phe-Leu-Leu-Ser-Asp-
Leu-Ile-Asn-Arg-Arg-Thr-Gln-Arg-Val-Asp-Gly-Gln-Pro-Met-
Ile-Gly-Met-Ser-Ser-Gln-Val-Glu-Glu-Val-Arg-Val-Thr-Glu-
Asp-Thr-Glu-Glu-Leu-Pro-Gly-Asp-Pro-Asp-Met-Ile-Arg-Tyr-
Ile-Asp-Glu-Phe-Gly-Gln-Thr-Thr-Thr-Arg-Met-Gln-COOH

VP3:

NH_2-Ala-Val-Asp-Leu-Tyr-Arg-Pro-Asp-Asp-Tyr-Tyr-Asp-Ile-
Leu-Phe-Pro-Gly-Val-Gln-Thr-Phe-Val-His-Ser*-Val-Gln-Tyr-
Leu-Asp-Pro-Arg-His-Trp-Gly-Pro-Thr-Leu-Phe-Asn-Ala-Ile-
Ser*-Gln-Ala-Phe-Trp-Arg-Val-Ile-Gln-Asn-Asp-Ile-Pro-Arg-
Leu-Thr-Ser*-Gln-Glu-Leu-Glu-Arg-Arg-Thr-Gln-Arg-Tyr-Leu-
Arg-Asp-Ser*-Leu-Ala-Arg-Phe-Leu-Glu-Glu-Thr-Thr-Trp-Thr-
Val-Ile-Asn-Ala-Pro-Val-Asn-Trp-Tyr-Asn-Ser*-Leu-Gln-Asp-
Tyr-Tyr-Ser*-Thr-Leu-Ser*-Pro-Ile-Arg-Pro-Thr-Met•-Val-Arg-
Gln-Val-Ala-Asn-Arg-Glu-Gly-Leu-Gln-Ile-Ser*-Phe-Gly-His-
Thr-Tyr-Asp-Asn-Ile-Asp-Glu-Ala-Asp-Ser*-Ile-Gln-Gln-Val-
Thr-Glu-Arg-Trp-Glu-Ala-Gln-Ser*-Gln-Ser*-Pro-Asn-Val-Gln-
Ser*-Gly-Glu-Phe-Ile-Glu-Lys-Phe-Glu-Ala-Pro-Gly-Gly-Ala-
Asn-Gln-Arg-Thr-Ala-Pro-Gln-Trp-Met•-Leu-Pro-Leu-Leu-Leu-
Gly-Leu-Tyr-Gly-Ser*-Val-Thr-Ser*-Ala-Leu-Lys-Ala-Tyr-Glu-
Asp-Gly-Pro-Asn-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Leu-Ser*-Arg-Gly-Ser*-
Ser*-Gln-Lys-Thr-Lys-Gly-Thr-Ser*-Ala-Ser*-Ala-Lys-Ala-Arg-
His-Lys-Arg-Arg-Asn-Arg-Ser*-Ser*-Arg-Ser*-COOH

Abb. 19

Aminosäuresequenz des VP1 und des VP3, abgeleitet nach der DNA Sequenz (Fiers et al.,1978) und Weissmann et al. (1977). Die tryptischen Peptide, die im 74K Protein identifiziert wurden, sind unterstrichen. Die Schnittstellen der markierten tryptischen Peptide sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das radioaktive Methionin wurde mit •, das radioaktive Serin mit * versehen.

E. DISKUSSION

I. Darstellung und Charakterisierung des 74K Proteins

Bei der Untersuchung der Proteinsynthese in Nierenzellen von Cercopithecus aethiops nach SV40 Infektion wurde in der späten Phase der Vermehrung neben den bekannten Strukturproteinen des Virus ein 74.000 Daltons Protein gefunden (Abb. 3). Zunächst wurde gezeigt, daß die Synthese des 74K Proteins nicht von der Verwendung einer bestimmten Zellinie oder von der Verwendung eines bestimmten Virusstammes von SV40 abhängt. So konnte das 74K Protein in primären und permanenten Affennierenzellen nach Infektion mit getrennt isolierten Virusstämmen nachgewiesen werden. Es ist daher nicht wahrscheinlich, daß Mutationen im Genom des Virus oder der Zelle die Synthese des Proteins auslösen.

Da das 74K Protein weder während der frühen Phase der Infektion in permissiven Zellen noch in SV40 transformierten Zellen nachgewiesen werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß die Synthese des Proteins im Zusammenhang mit der Expression der späten Region des Virusgenoms steht. Diese Annahme wurde durch die gleichzeitige Hemmung der Synthese des 74K Proteins und der Strukturproteine durch Cytosinarabinosid bestätigt (Abb. 6). Allerdings können diese Befunde nicht als Beweise dafür gelten, daß nicht auch schon vor der viralen DNA Replikation das 74K Protein synthetisiert wird. Obgleich durch die radioaktive Markierung der Proteine und der anschließenden Immunpräzipitation auch sehr geringe Mengen des Proteins erfaßt werden können, ist es dennoch denkbar, daß durch die Verwendung anderer Techniken die Nachweisgrenze herabgesetzt wird.

Mit Hilfe der zwei-dimensionalen Peptidanalysen wurde eine strukturelle Verwandschaft des 74K Proteins mit den Virusproteinen VP1 und VP3 festgestellt. In dem Peptidmuster des 74K Proteins wurden tryptische Peptide beider

Proteine gefunden. Alle im VP1 enthaltenen Peptide wurden auch im 74K Protein nachgewiesen (Abb. 13, 15). Zusätzlich gefundene Peptide des 74K Proteins konnten den tryptischen Peptiden des VP3 zugeordnet werden. Das VP3 weist jedoch 3 Peptide auf, die nicht im 74K Protein enthalten sind (Abb. 15). Es wird daher angenommen, daß das 74K Protein die gleiche Aminosäuresequenz wie das VP1 besitzt, doch zusätzlich auch Teile der Aminosäuresequenz des VP3 aufweist. Durch Abschätzung der Mobilitäten der einzelnen Peptide wird angenommen, daß die im 74K Protein nicht enthaltenen Peptide vom COOH-Terminus des VP3 stammen. Zur Bestätigung der Befunde ist geplant, die Aminosäuresequenz dieser Peptide zu bestimmen.
Bei der Interpretation der Peptidanalysen ist zu beachten, daß identisch wandernde Peptide nicht unbedingt gleiche Aminosäuresequenzen besitzen müssen. Durch die radioaktive Markierung der Proteine konnten nicht alle tryptischen Peptide erfaßt werden; die markierten Peptide geben daher nur einen Ausschnitt der insgesamt in den Proteinen enthaltenen Peptide wieder. Es besteht daher die Möglichkeit weiterer Übereinstimmungen bzw. Unterschiede der Proteine. Auch Verunreinigungen bei der präparativen Reinigung der Proteine können nicht gänzlich ausgeschlossen werden.
Das zu den Papovaviridae gehörende Polyomavirus ist dem SV40 Virus nahe verwandt. Es wird in permissiven Mäusezellen repliziert (Steward et al., 1958). Es war daher interessant zu untersuchen, ob ein dem 74K Protein entsprechendes Protein in Polyomavirus infizierten 3T6 Zellen gefunden werden konnte. Aus Extrakten infizierter 3T6 Zellen konnte mit einem Anti Polyomavirus-Serum vom Schaf das Hauptstrukturprotein VP1 spezifisch präzipitiert werden. Zusätzlich gefundene Proteine in diesem Immunpräzipitat konnten auch im Extrakt nicht infizierter Mäusezellen identifiziert werden. Da in den entsprechenden Versuchen mit SV40 das 74K Protein nicht in Kontrollzellen gefunden wurde, stellen diese Proteine keine "Kandidaten" für ein dem 74K Protein analoges Polypeptid dar. Es ist allerdings möglich, daß durch die gewählten Versuchsanordnungen das dem 74K Protein entspre-

chende Protein nicht erfaßt werden konnte, da die Extraktionsbedingungen ursprünglich zur Isolierung des großen Tumorantigens von SV40 angelegt waren. Darüberhinaus ist die Identifizierung eines solchen Proteins dadurch erschwert, weil nicht unbedingt zu erwarten ist, daß die Proteine gleiche Molekulargewichte besitzen (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen zur Klärung dieses Problems werden an unserem Lehrstuhl weitergeführt.

Die Extraktion und Isolierung von Proteinen aus den komplexen Strukturen der Zelle stellt ein zentrales Problem der biochemischen Methodik dar. Beim Aufschluß von Zellen sind die Grundprobleme die Zerstörung der biologischen Eigenschaften der zu isolierenden Komponenten und die Entstehung nicht natürlich vorliegender Strukturen. Zunächst soll auf eine mögliche artifizielle Entstehung des 74K Proteins eingegangen werden. Nach verschiedenen Methoden des Zellaufschlusses und nach Verwendung von Puffersystemen unterschiedlicher Zusammensetzung wurde das 74K Protein dargestellt (Abb. 4). Daher ist anzunehmen, daß es sich bei dem 74K Protein um ein Molekül handelt, welches auch in der Zelle vorliegt.
Bei einer Konzentration von 140 mM NaCl konnten relativ große Mengen des 74K Proteins aus infizierten Zellen extrahiert werden. Da bei niedrigen oder hohen Salzkonzentrationen weniger Protein extrahiert wurde, ist anzunehmen, daß eine bestimmte Salzkonzentration für das Herauslösen des 74K Proteins aus der Zelle erforderlich ist. Andererseits ist auch denkbar, daß die Löslichkeit des Proteins von der Ionenstärke abhängt.

Der direkte Nachweis des 74K Proteins in der infizierten Zelle könnte durch die Verwendung monoklonaler Antikörper (Köhler and Milstein, 1976) in der Immunfluoreszenz erbracht werden. Fernerhin könnte durch diese Technik die gefundene intrazelluläre Verteilung des 74K Proteins bestätigt werden. Da jedoch die Herstellung monoklonaler Antikörper sehr aufwendig ist, wurden diese Versuche nicht durchgeführt.
Die Identifizierung des 74K Proteins nach in vitro Trans-

lation einer für das 74K Protein kodierenden messenger RNA würde schließlich als stärkster Hinweis für die ausschließlich biologische Genese des Proteins gelten. Auf die Frage, ob eine mRNA für das 74K Protein kodiert, soll im folgenden Abschnitt ausführlich eingegangen werden.

II. Modelle zur Entstehung des 74K Proteins

Verschiedene Arten der Bindung können zur Erklärung der Entstehung des 74K Proteins aus seinen Komponenten herangezogen werden.
Es ist denkbar, daß die Untereinheiten des 74K Proteins über Nebenvalenzen miteinander verbunden sind, auch kovalente Bedingungen könnten zur Verknüpfung der Komponenten beitragen.
Ebenso besteht die Möglichkeit, daß eine individuelle messenger RNA für das 74K Protein kodiert.
Bei den Untersuchungen zur Synthese des Tabak-Mosaik-Virus wurde gezeigt, daß bestimmte Bauteile, die Scheiben- und Lockenwicklerstrukturen, durch Aggregation aus kleineren Proteinuntereinheiten entstehen. Diese Bauteile werden im Verlauf der Virusreifung durch Konformationsänderungen so zusammengefügt, daß schließlich das reife Virus entsteht. Die Zusammenlagerung der Proteinuntereinheiten zu den Scheiben- und Lockenwicklerstrukturen ist vom pH Milieu und der Ionenstärke abhängig. Bei niedrigen Salzkonzentrationen und hohen pH-Werten zerfallen die Bauteile in ihre Untereinheiten (Butler and Klug, 1979). Im Gegensatz dazu konnte das 74K Protein bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und pH-Werten dargestellt werden. Die Bindung über Nebenvalenzen bietet keine ausreichende Erklärung für den Zusammenhalt der Untereinheiten. Durch die Vorbehandlung der Proteine für die Elektrophorese (3 minütiges Erhitzen der Proben auf 100°C, 3% Na-Dodecylsulfat) werden Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen oder hydrophobe Bindungen zerstört. Eine Dissoziation des 74K Proteins in seine Komponenten wurde

nicht nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, ob das 74K Protein in der Zelle aus dem VP1 mit dem VP3 gebildet wird. Voraussetzung für die Entstehung des 74K Proteins durch Bindung der Protomere wäre die Abspaltung der nur im VP3 enthaltenen Peptide durch Peptidasen. Eine Verknüpfung der Polypeptidketten über Disulfidbrücken kann ausgeschlossen werden, da das VP3 kein Cystein enthält.
Aus der Literatur geht hervor, daß das VP1 keinen oder nur einen sehr geringen Kohlenhydratanteil aufweist. (Kempe et al., 1979). Daher ist nicht anzunehmen, daß die Peptidketten über Zuckerreste miteinander verbunden sind. 1972 beschrieben Tan und Sokol die Phosphorylierung des VP1. Es können daher auch Phosphorester- und Phosphordiesterbindungen die Untereinheiten verknüpfen. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß freie Säure- und Alkoholgruppen der Aminosäuren Esterbindungen zwischen Polypeptidketten bilden können.

Ausgehend vom Replikationsursprung der viralen DNA Synthese liegen die Gene für die Strukturproteine VP2/VP3 und VP1 tandemartig hintereinander. Durch Verwendung von Deletionsmutanten und mit Hilfe zwei-dimensionaler Peptidanalysen wurde geschlossen, daß VP2 und VP3 im gleichen Leseraster und teilweise vom gleichen Genomabschnitt transkribiert werden. Die Proteine besitzen gleiche C-Termini (Rozenblatt et al., 1976; Cole et al., 1977). Die N-terminalen Sequenzen des VP1 überschneiden sich mit den C-terminalen Sequenzen des VP2 und des VP3 (Fiers et al., 1978; Reddy et al., 1978).
Die Transkription der mRNAs vom späten Genomabschnitt der SV40 DNA beginnt im Bereich der Kartenposition 0,67 (Khoury et al., 1975, 1976; Laub, 1979). Auch die Replikation der viralen DNA beginnt an dieser Stelle (Danna and Nathans, 1972; Fareed, Garon and Salzmann, 1972; Salzmann et al., 1972). Es wurde nachgewiesen, daß das T-Antigen eine hohe Affinität zum Replikationsursprung aufweist (Reed et al., 1975; Tjian, 1978). Die Transkription verläuft im Uhrzeigersinn und endet vor dem Initiationsort der DNA Replikation. Die primären Transkripte weisen eine Länge auf, die 70 bis 100% der Länge

des viralen Genoms entsprechen (Ford and Hsu, 1978). In der DNA-Sequenz von SV40 konnten mögliche Stopstellen für die RNA-Polymerase identifiziert werden, jedoch ist noch nicht bekannt, an welcher Stelle das Enzym die Transkription beendet. Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch der vorzeitige Kettenabbruch eine wichtige Rolle bei der Regulation der späten Genexpression spielt (Aloni et al., 1982).

Durch 5'-5' Kondensation wurden an die 5' Enden der primären Transkripte 7-Methyl-Guanosin angelagert. Die Spaltung der RNAs durch Endonukleasen setzt neue 3' Enden frei, die nachfolgend polyadenyliert werden. Durch Herausschneiden bestimmter nicht kodierender Sequenzen und anschließender Ligation der Intermediate (splicing) entstehen so die reifen mRNA Moleküle. Sie werden anschließend in das Zytoplasma transportiert (Übersicht siehe Tooze, 1980). Die Translation der reifen, isolierten mRNAs im zellfreien System führt zur Synthese der Strukturproteine. Die für das VP1 kodierende RNA sedimentiert mit einer Konstanten von 16S (Prives et al., 1975; Khoury et al., 1976). Die in vitro Translationsprodukte der 19S mRNA Spezies sind vorwiegend die Strukturproteine VP2 und VP3 (Smith et al., 1979). Im Gegensatz zur Synthese der Proteine in der infizierten Zelle werden in vitro mehr VP2 Moleküle als VP3 Moleküle synthetisiert. Die Synthese der Proteine erfolgt unabhängig voneinander (Hunter 1979). Bei der in vitro Translation der 19S mRNAs wurden geringe Mengen des VP1 nachgewiesen, die nicht auf eine Kontamination durch die 16S mRNA zurückgeführt werden konnte.

Bei diesen Untersuchungen wurde das 74K Protein nicht nachgewiesen. Allerdings schließen diese Befunde nicht aus, daß eine mRNA mit einer anderen S-Konstante für das 74K Protein kodiert. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß die mRNA für das 74K Protein besondere "leader" Sequenzen aufweist, deren regulatorische Funktion für die Synthese des 74K Proteins im in vitro System nicht zum Tragen kommt. Es wäre denkbar, daß mRNA Moleküle der späten Region, die einer anderen Prozessierung unterliegen, wie sie für die Strukturproteine beschrieben worden sind, für

das 74K Protein kodieren. Durch Herausschneiden der für den Bereich des C-Terminus von VP3 kodierenden Sequenzen könnte eine mRNA entstehen, deren Translation sowohl im Leseraster des VP3 und des VP1 erfolgen würde. Dieser Vorgang könnte sich sowohl an den 19S mRNA Spezies als auch an noch unvollständig prozessierten 16S mRNA Molekülen ereignen. Auch im Wirtszellgenom integrierte virale DNA Sequenzen können als Matritze für die Transkription dienen (Türle et al., 1977; Sokol et al., 1974). Daher kann vermutet werden, daß auch unter diesen Transkripten mRNA Moleküle zur Synthese des 74K Proteins führen können.
Es ist geplant, mit Hilfe von Anti 74K-Antikörpern das Protein zusammen mit der RNA von den Ribosomen zu isolieren. Die anschließende Translation könnte Aufschlüsse über die hier vorgestellten Modelle zur Synthese des 74K Proteins geben.

III. Mögliche Funktion des 74K Proteins

Hinweise zum Verständnis von Proteinen können durch die Identifizierung der funktionellen Komplexe, mit denen die Proteine in Wechselwirkung treten oder dessen Bestandteile sie sind, erhalten werden. Auch virale Proteine können oft nur ihre Funktion im Zusammenspiel mit anderen Proteinen erfüllen.
Es war daher wichtig zu untersuchen, ob das 74K Protein mit bestimmten Proteinen assoziiert ist. Die Proteine sollten durch Immunpräzipitation mit verschiedenen Antiseren dargestellt werden.
Antikörper, die gegen das Strukturprotein VP1 gerichtet sind, präzipitieren aus Extrakten infizierter Zellen das VP1 und das 74K Protein (Abb. 8). Durch zwei-dimensionale Peptidanalysen konnte eine strukturelle Verwandschaft der Proteine gezeigt werden. Es ist daher zu vermuten, daß die gegen VP1 gerichteten Antikörper ebenfalls spezifisch das 74K Protein binden. Auch durch Anti VP3-Serum wurde

das 74K Protein immunpräzipitiert (Abb. 10). Das Ergebnis dieses Versuches läßt sich durch die teilweise strukturelle Übereinstimmung des VP3 mit dem 74K Protein erklären. Da jedoch in diesem Immunpräziptat das VP1 nachgewiesen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Proteine in komplexierter Form vorliegen. In diesem Zusammenhang sei das 83K Protein erwähnt, das ebenfalls in diesen Immunpräzipitaten gefunden wurde und dessen strukturelle Beziehung zum VP1 in den Peptidanalysen aufgezeigt werden konnte.

Die Verwendung von Antiseren, die gegen die Strukturproteine gerichtet sind, können auf Grund der vermuteten Kreuzreaktion keine eindeutige Antwort auf die Frage einer physikalischen Assoziation des 74K Proteins mit den Strukturproteinen geben.

Die Präzipitation des 74K Proteins durch Hamster Anti T-Serum beruht wahrscheinlich nicht auf der Erkennung des 74K Proteins durch Antikörper dieses Serums (Abb. 9). Da die Tiere mit SV40 transformierten Zellen immunisiert wurden, ist nicht zu erwarten, daß die Seren Antikörperqualitäten gegen die Spätproteine von SV40 besitzen. Es ist denkbar, daß das 74K Protein zusammen mit dem VP1 durch unspezifische Bindung an die Staphylokokken präzipitiert wird. Diese Erklärung ist jedoch nicht wahrscheinlich, da in Kontrollexperimenten, in denen anstatt des Immunserums nur die Staphylokokken verwendet wurden, nur sehr geringe Mengen Protein nachgewiesen werden konnten. Da in den Anti T-Präzipitaten sowohl das VP1 als auch das 74K Protein nachgewiesen wurde, deutet dies auf eine Komplexierung des T-Antigens mit dem VP1 und dem 74K Protein hin. Wie aus der Literatur hervorgeht, liegt das T-Antigen sowohl in ungebundener als auch in komplexierter Form mit verschiedenen Proteinen vor (Kress and May, 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979; Rundell et al., 1979; Simon, 1979; Segawa et al., 1980). Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß am SV40 Minichromosom die Strukturproteine und das T-Antigen nachgewiesen wurden (Segawa et al., 1980). Durch Immunpräzipitation mit Hamster Anti T-Serum konnten die Strukturproteine, das T-Antigen und ein 85K Protein am SV40 Nuk-

leoproteinkomplex nachgewiesen werden. Fernerhin wurden bei der zwei-dimensionalen Auftrennung, durch isoelektrische Fokussierung und SDS-Gelelektrophorese, Proteine dargestellt, die mit dem SV40 Chromosom sedimentieren. Proteine mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie das 74K Protein wurden bei diesen Untersuchungen beschrieben (Milavetz et al., 1980). Im Ergebnisteil der Arbeit wurde schon erwähnt, daß ein gegen das T-Antigen von Polyomavirus gerichteter monoklonaler Antikörper auch das Hauptstrukturprotein des Virus quantitativ präzipitiert. (Griffin et al., 1982). Auch diese Befunde sprechen für eine Copräzipitation des T-Antigens mit dem VP1. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Proteine eine gleiche Antigendeterminante besitzen, die durch den monoklonalen Antikörper erkannt wird. Falls das 74K Protein in einem Komplex mit dem T-Antigen und dem VP1 vorliegt, sollte auch das T-Antigen durch Anti VP1-Seren präzipitiert werden. In Immunpräzipitaten aus pH 9,0 Extrakten SV40 infizierter Zellen mit Kaninchen Anti VP1-Serum konnte das T-Antigen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Jedoch wurde nach der Auftrennung der Zellextrakte im Sucrosegradienten aus einigen Fraktionen ein Protein mit dem gleichen Molekulargewicht wie das T-Antigen zusammen mit dem VP1 und dem 74K Protein durch das Anti VP1-Serum präzipitiert (Abb. 12).

Durch Copräzipitation des 74K Proteins mit dem T-Antigen sollte auch das mit dem T-Antigen assoziierte zelluläre 53K Protein dargestellt werden können. In den durchgeführten Versuchen mit dem Tumorserum konnte jedoch kein Beweis für die Präzipitation des 53K Proteins erbracht werden. Auch durch Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern, die gegen das 53K Protein gerichtet waren (Gurney et al., 1980), konnte aus pH 9,0 Extrakten infizierter Zellen das Protein nicht nachgewiesen werden.

Bei den Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Proteinsynthese in lytisch infizierten Zellen konnte ein 68K Protein durch das Tumorserum präzipitiert werden. 12 bis 20 Stunden nach Infektion der Zellen war das 68K Protein nachweisbar. Aus Extrakten, die zu früheren oder späteren Zeitpunkten gewonnen wurden, konnte das Protein nicht prä-

zipitiert werden. Ob dieses Protein identisch mit dem von Lane und Hoeffler (1980) beschriebenen 68K Protein ist, konnte nicht festgestellt werden. Das von Lane beschriebene 68K Protein wird durch ein gegen T-Antigen gerichteten monoklonalen Antikörper aus Extrakten transformierter Zellen präzipitiert. Das 68K Protein wird auch durch diesen monoklonalen Antikörper in "T-Antigen-freien" Säugetierzellen erkannt. Die Kreuzantigenität des 68K Proteins mit dem T-Antigen deutet auf eine ähnliche Funktion dieser Proteine hin. Die Beteiligung an Transformationsprozessen wurde von den Autoren diskutiert. Die Befunde sprechen zunächst nicht für eine Beziehung zu den Strukturproteinen. Es wäre dennoch interessant zu untersuchen, ob das von Lane beschriebene Protein auch wie das hier vorgestellte 68K Protein zu bestimmten Zeitpunkten der lytischen Infektion mit dem T-Antigen komplexiert (Daten nicht gezeigt). Das 74K Protein ist vorwiegend im Kern infizierter Affennierenzellen lokalisiert (Abb. 5). Da auch der Zusammenbau von SV40 im Kern stattfindet, ist es möglich, daß das 74K Protein an diesen Prozessen beteiligt ist. Das 74K Protein wurde nicht im fertigen Virus nachgewiesen (Abb. 11). Es kann daher vermutet werden, daß dem Protein die Funktion eines Gerüstproteins bei der Montage des Virus zukommt. Beim Zusammenbau des Adenovirus wurden Polypeptide mit Molekulargewichten von 50K und 39K an Intermediaten nachgewiesen, die bei der weiteren Fortschreitung der Synthese des Virus wieder von den Komplexen dissoziieren (Martin et al., 1978).

Die Isolierung und Charakterisierung verschiedener DNA-Proteinkomplexe, die als Zwischenstufen beim Aufbau des Virus fungieren, wurden beschrieben (Howe and Tan, 1977; Aloni et al., 1980; Coca-Prados and Hsu, 1979; Otto and Fanning, 1979; Fanning et al., 1980). Versuche zum Nachweis des 74K Proteins an ruhenden und wachsenden Nukleoproteinkomplexen werden zur Zeit an unserem Lehrstuhl durchgeführt. Sie sollen Aufschluß über die Beteiligung des 74K Proteins an Zwischenstufen geben, die zum Zusammenbau des Virus führen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang das Histon H1, das in den oben erwähnten Zwischenstufen nachgewiesen wurde, jedoch kein Bestandteil

reifer Viruspartikel ist (Griffith and Christiansen, 1977).

Bei den Untersuchungen zur Auswirkung der SV40 Infektion auf die Zusammensetzung chromosomaler Proteine in Affennierenzellen konnte von einer anderen Arbeitsgruppe unseres Lehrstuhls ein 76K Protein dargestellt werden. Es wurde nachgewiesen, daß das 76K Protein am Chromatin der infizierten Zelle assoziiert ist. Durch "pulse-chase" Experimente wurde eine vom T-Antigen und VP1 verschieden lange Verweildauer des Proteins am Chromatin aufgezeigt. Da die Synthese des 76K Proteins auch durch Cytosinarabinosid gehemmt wird, und das Protein durch Anti SV40-Serum präzipitiert wird, soll geprüft werden, ob das 76K Protein mit dem 74K Protein identisch ist.
Im Falle des SV40 sind die mit den Transkriptinskomplexen assoziierten Proteine noch wenig untersucht. Daher ist unklar, ob das 74K Protein an den Prozessen der Transkription beteiligt war.
Den mit dem SV40 Chromosom sedimentierenden Proteinen konnten enzymatische Aktivitäten zugeordnet werden. Entspiralisierende Enzyme, DNA- und RNA- Polymerasen wurden beschrieben (Otto et al., 1978; Keller et al., 1977; Edenberg, Anderson and De-Pamphilis, 1978). Für das Verständnis der biologischen Funktion wäre es bedeutsam, eine mögliche katalytische Eigenschaft des 74K Proteins nachzuweisen.

F. ZUSAMMENFASSUNG

In SV40 infizierten Affennierenzellen wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von 74.000 Daltons (74K Protein) nachgewiesen. In Extrakten SV40 transformierter Zellen wurde das Protein nicht gefunden. Die Synthese des 74K Proteins erfolgt in der späten Phase der Vermehrung des Virus. Durch Blockierung der viralen DNA Replikation mit Cytosinarabinosid konnte die Synthese der Strukturproteine und des 74K Proteins gehemmt werden. Bei der Fraktionierung infizierter Zellen zeigte sich, daß das 74K Protein vorwiegend im Kern lokalisiert ist. Im gereinigten Virus wurde das 74K Protein nicht identifiziert.

Zur immunologischen Charakterisierung des Proteins wurden in verschiedenen Tierspezies Antikörper gegen die gereinigten Strukturproteine VP1 und VP3 hergestellt. Diese Antikörper präzipitierten spezifisch das VP1, das VP3 und das 74K Protein aus Extrakten infizierter Zellen. Zusammen mit dem großen Tumorantigen wurde das 74K Protein durch Hamster Anti SV40-Tumor-Serum immunpräzipitiert.

Durch zwei-dimensionale Peptidanalysen wurde die strukturelle Beziehung des 74K Proteins zu den Virusproteinen untersucht. Die Proteine wurden durch Immunpräzipitation gereinigt und nach der anschließenden Elektrophorese isoliert. Außerdem wurden die Strukturproteine aus dem reifen Virus gewonnen. Durch den Vergleich der zwei-dimensionalen Peptidmuster der Proteine wurde festgestellt, daß das Strukturprotein VP1 gleiche tryptische Peptide wie das 74K Protein aufweist. Zusätzlich gefundene Peptide des 74K Proteins konnten im Muster des Strukturproteins VP3 identifiziert werden. Jedoch enthält das Virusprotein 3 tryptische Peptide, die nicht im 74K Protein nachgewiesen werden konnten.

Durch die Auftrennung infizierter Zellextrakte im Sucrosegradienten konnten durch die anschließende Immunpräzi-

pitation verschiedene mit dem 74K Protein und dem VP1 komplexierte Proteine dargestellt werden.
Die Beteiligung des 74K Proteins beim Zusammenbau des Virus wird diskutiert.

G. L I T E R A T U R

Y. Aloni, H. Skolnik-David, N. Hay	Site of premature termination of late transcription of simian virus 40 DNA: Enhancement by 5,6-dichloro-1-ß-D-ribofurano-sylbenzimidazole. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 2743-2747 (1982)
M.A. Anderer, M.D. Schlumberger, H.J. Eggers	The structure of simian virus 40. II. Symmetry and components of the virus particle. Virology 32: 511-523 (1967)
G. Barbanti-Brodano, P. Swetly, H. Koprowski	Early events in the infection of permissive cells with SV40: adsorption, penetration and uncoating. J. Virol. 6: 78-86 (1970)
A.J. Berk and Sharp	Sizing and mapping of early adenovirus mRNA by gel-elextrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. Cell 12: 721-732 (1977)
W.M. Bonner and Laskey	A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acid in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88 (1974)
N. Bouck, N. Beales, T. Shenk, P. Berg, G. di Mayorca	New regions of simian virus 40 genome is required for efficient viral transformation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 2473-2477 (1978)
P. Bourgaux, D. Bourgaux-Ramoisy, P. Seiler	The replication of the ring-shaped DNA of polyoma virus. II. Identification of the molecules at various stages of replication. J. Mol. Biol. 59: 195-206 (1971)
J.S. Brugge and J.S. Butel	Role of simian virus 40 gene function in maintenance of transformation. J. Virol. 15: 619-635 (1975)
W. Büttner and H. Werchau	Incoporation of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) into SV40 DNA. Virology 52: 553-561 (1973)
J.G. Butler and A. Klug	Wie bildet sich ein Virus? Spektrum der Wissenschaft, Januar: 5-14 (1979)

M. Coca-Prados and M.-T. Hsu — Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes II. Biochemical and electron microscopic analysis of simian virion assembly. J. Virol. 31: 199-208 (1979)

M. Coca-Prados, G. Vidali, M.-T. Hsu — Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes III. Study of Histon modifications. J. Virol. 36: 353-360 (1980)

R.B. Carroll and A.E. Smith — Monomer molecular weight of T antigen from simian virus 40-infected and transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 2254-2258 (1976)

P. Chambon — The molecular biology of the eucariotic genome is coming of age. Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol. 42: 1209-1234 (1977)

C.N. Cole, T. Landers, S.P. Goff, S. Manteuil-Brutlag, P. Berg — Physical and genetic characterization of deletion mutants of simian virus 40 in vitro. J. Virol. 24: 277-294 (1977)

K.J. Danna and D. Nathans — Bidirectional replication of simian virus 40 DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 3097-3100 (1972)

W. Deppert and G. Walter — Simian virus (SV40) tumor-specific proteins in nucleus and plasma membrane of HeLa cells infected by adenovirus 2-SV40 hybrid-virus $Ad2^{+}ND2$. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 2505-2509 (1976)

S.M. Dilworth and B.E. Griffin — Monoclonal antibodies against polyoma virus tumor antigens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79: 1059-1963 (1982)

H. Eagle — Amino acid metabolism, in mammalian cell cultures. Science 130: 432-437 (1959)

B.E. Eddy, G.S. Bormann, G.E. Grubbs, R.D. Young — Identification of the oncogenic substance in rhesus monkey kidney cell cultures as simian virus 40. Virology 17: 65-75 (1962)

H.J. Edenberg, M.A. Waquar, J.H. Huberman	Subnuclear system for synthesis of simian virus 40 DNA in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 4392-4396 (1976)
E. Fanning and I. Baumgartner	Role of fast sedimenting SV40 nucleoprotein complexes in virus assembly. Virol. 102: 1-12 (1980)
G. Fareed, C.F. Garon, N.P. Salzman	Origin and direction of simian virus 40 deoxyribonucleic acid replication. J. Virol. 10: 484-941 (1972)
G. Fareed and N.P. Salzman	Intermediate in SV40 DNA chain growth. Nature 238: 274-277 (1972)
G. Felsenfeld	Chromatin. Nature 271: 115-121 (1978)
R. Fernandez-Munoz, M. Coca-Prados, M.-T.Hsu	Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. I. Methods of isolation and characterization in CV-1 cells. J. Virol. 29: 612-623 (1979)
W. Fiers, R. Contreras, G. Haegeman, R. Rogiers, A. van de Voorte, H. van Heuverswyn, J. van Herreweghe, G. Volkaert, M. Ysebaert	Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. Nature 273: 113-120 (1978)
J.P. Ford and M.-T. Hsu	Transcription pattern of in vivo labelled late simian virus 40. RNA: Equimolar transcription beyond the mRNA 3'terminus. J. Virol. 28: 795-801 (1978)
E.L. Gershey and E.G. Diakumakos	Simian virus 40 production after viral uncoating in the CV-1 nucleus. J. Virol. 28: 415-416 (1978)
V.R. Gilden, R.J. Carp, F. Taguchi, V. Defendi	The nature and localisation of the SV40 induced complement fixing antigen. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53: 684-692 (1965)
A.J. Girardi, B.H. Sweet, V.P. Slotnick, M.R. Hillemann	Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with the vacuolating virus SV40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 649-660 (1962)

A. Gressmann, M. Gressmann, E. Ghul, C. Müller	Quantitative correlation between simian virus 40 T-antigen synthesis and late viral gene expression in permissive and nonpermissive cells. J. Cell. Biol. 77: R1-R8 (1978)
J.D. Griffith and G. Christiansen	The multifunctional role of H1 probed with the SV40 minichromosomes. Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol. 42: 215-226 (1977)
E. Gurney, R. Harrison, J. Fenno	Monoclonal antibodies against simian virus 40 antigens: Evidence for distinct subclasses of large T-antigen and for similarities among nonviral T-antigen. J. Virol. 34: 752-763 (1980)
J.C. D'Hallium, G. Torpier, P.A. Boulanger, G.R. Martin	Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. J. Virol. 26: 357-363 (1978)
M. Horowitz, O. Laub, S. Bratosin, Y. Aloni	Splicing of SV40 late mRNA is a post-transcriptional process. Nature 275: 558-559 (1978)
C.C. Howe and K.B. Tan	Nucleoprotein complexes from simian virus 40 infected monkey cells: association of viral DNA with histones and the major viral structural protein. Virology 78: 45-56 (1977)
F. Hölzel and F. Sokol	Integration of progeny simian virus 40 DNA into host cell genome. J. Mol. Biol. 84: 423-444 (1974)
K. Hummeler, N. Tomassini, F. Sokol	Morphological aspects of uptake of simian virus 40 by permissive cells. J. Virol. 6: 87-93 (1970)
T. Hunter, M.A. Hutchinson, W. Eckhart	Translation of polyoma virus T antigens in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 5917-5921 (1978)
T. Hunter	Functional characterisation of the early and late mRNAs of simian virus 40. Virology 95: 511-522 (1979)
R. Jaenisch and A. Levine	DNA replication in SV40-infected cells. Circular and catenated oligomers of SV40 DNA. Virology 44: 480-493 (1971)

E.B. Jakobovitis and Y. Aloni
Isolation and characterization of varius forms of simian virus 40 DNA-protein complexes. Virology 102: 107-118 (1980)

J.F. Kearney, A. Radbruch, B. Liesengang, K. Rajewski
A new mouse myoloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. 123: 1548-1557 (1979)

W. Keller, U. Müller, J. Eicken, J. Wendel, H. Zentgraf
Biochemical and ultrastructural analysis of SV40 chromatin. Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol. 42: 227-244 (1978)

T.D. Kempe, W.G. Beattie, S. Weissman, W. Königsberg
Correlation of the protein and nucleic acid sequence for the major structural protein of simian virus 40. J. Biol. Chem. 254: 7561-7569 (1979)

S.W. Kessler
Rapid isolation of antigens from cells with a staphyloccocae protein A-antibody-antigen adsorbent: parameters of the interaction of the antibody-antigen-complexes with protein A. J. Immunol. 115: 1617-1623 (1975)

G. Khoury, P. Howley, D. Nathans, M.A. Martin
Post-transcriptional selection of simian virus 40-specific RNA. J. Virol. 15: 433-437 (1975)

G. Khoury, P.J. Carter, F.-J. Ferdinand, M.P. Howley, M. Brown, M.A. Martin
Genome localisation of simian virus 40 RNA species. J. Virol. 17: 832-840 (1976)

G. Klein
Viral oncology Raven Press, NY (1980)

G. Köhler and C. Milstein
Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976)

H. Koprowski, F.C. Jensen, Z. Steplewski
Activation of production of infectious tumor virus SV40 in heterokaryon cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58: 127-133 (1967)

R.D. Kornberg
Structure of chromatin. Ann. Rew. Biochem. 46: 931-955 (1977)

M. Kress, E. May, Cassingena, P. May — Simian virus 40 transformed cells expressed new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. J. Virol. 31: 472-483 (1979)

U.K. Laemmli — Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

D.P. Lane and L.V. Crawford — T-antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 278: 261-263 (1979)

D.P. Lane and Hoeffler — SV40 large T shares antigenic determinants with a cellular protein of 68.000. Nature 288: 167-170 (1980)

R.A. Laskey and A.D. Mills — Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gel by fluorography. Eur. J. Biochem. 56: 335-341 (1975)

O. Laub, S. Bratosin, M. Horowitz, Y. Aloni — The initiation of transcription of SV40 DNA at late times after infection. Virology 92: 310-323 (1979)

D.H. Linzer and A.J.Levine — Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 17: 43-52 (1979)

O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, C. Farr, K.J. Randell — Protein messurement with Folin reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)

J.V. Maizel — Polyacrylamide gel elextrophoresis of viral proteins. In "Methods in Virology". Academic Press, NY, Vol 5: 179-246 (1971)

S. Manteuil and Girad — Inhibitors of DNA-synthesis: their influence on replication and transcription of simian virus 40 DNA. Virology 60: 438-454 (1974)

R.G. Martin and J.Y. Chou — Simian virus 40 functions required for the establishment and maintenance of malignant transformation. J. Virol. 15: 599-612 (1975)

A.M. Maxam and W. Gilbert — A new method for sequencing DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 560-564 (1977)

J.L. Melnick	Papova virus group. Science 135: 1128-1130 (1962)
B.J. Milavetz, L.D. Spotila, R. Thomas, J.A. Hubermann	Two-dimensional analysis of proteins sedimenting with simian virus 40 chromosomes. J. Virol. 35: 854-864 (1980)
B. Otto and E. Fanning	DNA polymerase α is associated with the replicating SV40 nucleoprotein complexes. Nucleic Acid Res. 5: 1715-1728 (1978)
H.L. Ozer and Tegtmeyer	Synthesis and assembly of simian virus 40. I. Synthesis of the major capsid protein and its incorporation into viral particles. J. Virol. 9: 52-60 (1972)
T. Patschinsky	Untersuchungen zur Charakterisierung eines Frühproteins aus SV40-infizierten Affennierenzellen. Diplomarbeit, Tübingen (1974)
T. Patschinsky	Induktion der Synthese eines 74K-Proteins in Säugetierzellen nach Infektion mit dem onkogenen Virus SV40 und nach Serumstimulation. Dissertation, Bochum (1978)
C.L. Prives, H. Aviv, E. Gilboa, M. Reval, E. Winocour	The cell-free translation of early and late classes of SV40 messenger RNA. I.N.S.E.R.M. 37: 305-312 (1975)
V.B. Reddy, B. Thimmappaya, R. Dhar, K.N. Subramanian, B.S. Zain, J. Pan, P.K. Gosh, L.M. Celma, S.M. Weissman	The genome of simian virus 40. Science 200: 494-502 (1978)
L.J. Reed and H. Münch	A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer. J. Hyg. 27: 493-497 (1938)
S.J. Reed, J. Ferguson, R.W. Davis, G.R. Stark	T antigen binds to simian virus 40 DNA at the origin of replication. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 1605-1609 (1975)
S. Rozenblatt, R.C. Mulligan, M. Gerecki, B.E. Roberts, A. Rich	Direct biochemical mapping of eucariotic viral DNA by means of a linked transcription-translation cell-free system. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 2747-2751 (1976)

E.D. Sebring, T.J. Kelly, M.M Thoren, N.P. Salzman — Structure of replicating SV40 DNA molecules. J. Virol. 8: 479-490 (1971)

J.J. Sedmak and S.E. Grossberg — A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. Anal. Biochem. 79: 544-552 (1977)

J.G. Seehafer and R. Weil — Synthesis of polyoma virus structural polypeptides in mouse kidney cells. Virology 58: 75-85 (1974)

M. Segawa, S. Sugano, Yamaguchi — Association of SV40 T-antigen with replicating nucleoprotein complexes of SV40. J. Virol. 35: 320-330 (1980)

H.M. Shein and J.F. Enders — Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48: 1164-1168 (1962)

D.T. simmons, C. Chang, M.A. Martin — Multiple forms of polyoma virus tumor antigens from infected and transformed cells. J. Virol. 29: 881-887 (1979)

M.J. Sleigh, W.C. Topp, R. Hanisch, J.F. Sambrook — Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells. Cell 14: 79-88 (1978)

A.E. Smith, R. Smith, E. Paucha — Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. Cell 18: 335-346 (1979)

S.E. Steward, B.E. Eddy, N. Borgese — Neoplasma in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. J. Nat. Cancer Inst. 20: 1223-1230 (1958)

B.H. Sweet and M.R. Hillemann — The vacuolating virus, SV40. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105: 420-513 (1960)

K.B. Tan and F. Sokol — Structural proteins of simian virus 40 phosphoproteins. J. Virol. 10: 985-994 (1972)

P. Tegtmeyer — Simian virus 40 deoxyribonucleic synthesis: The viral replicon. J. Virol. 10: 591-598 (1972)

P. Tegtmeyer — Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. J. Virol. 15: 613-618 (1975)

R. Tjian and A. Robbins — Enzymatic activities associated with purified simian virus 40 T-antingen-related proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 610-614 (1979)

G. Todaro, G.K. Lazar, H. Green — The initiation of cell division in a contact-inhibited mammalian cell line. J. Cell Comp. Physiol. 66: 325-334 (1965)

J. Tooze — DNA tumor viruses, molecular biology of DNA tumor viruses, part. 2. Cold Spring Habor Laboratories Cold Spring Habor, NY (1980)

H. Türler — Interactions of polyoma and mouse DNAs. IV. Time course and extent of integration of polyoma DNA into mouse DNA during lytic infection. J. Virol. 23: 272-285 (1977)

G. Walter, R. Robbin, R. Dulbecco — Protein synthesis in simian virus 40-infected and transformed cells. Proc. Nat. Acad. Sci, USA 69: 921-924 (1976)

W.T. Wang and A. Roman — Cessation of reentry of simian virus 40 DNA into replication and its simultaneous appearance in nucleoprotein complexes of the maturation pathway. J. Virol. 39: 255-261 (1981)

R. Weil — Viral tumor antigens, a novel type of mammalian regulator protein. Biochem., Biophys. Acta. 561: 301-388 (1978)

R.A. Weinberg — How does T antigen transform cells? Cell 12: 243-246 (1977)

E. Wist, H. Krokan, H. Prydz — Effects of 1-ß-D-arabinofuranosylcytosine triphosphate on DNA-synthesis in insolated HeLa cell nucleic. Biochem. 15: 3647-3652 (1976)

Y. Young, P. Hearing, K. Rundell — Cellular proteins associated with simian virus early gene products in newly infected cells. J. Virol. 147-154 (1979)

J.S. Youngner — Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of trypsindispersed monkey kidney cells. Proc. Soc. Exp. Biol. 85: 202-205 (1954)

L E B E N S L A U F

Name:	Bernd Ulrich Krippl
Anschrift:	Woltersberg 6, 5600 Wuppertal 1
Geburtstag:	21. September 1950
Geburtsort:	Bad Neuenahr
Eltern:	Helmut und Marie Luise Krippl
Schulausbildung:	1957-1962 Besuch der Volksschule Opphof in Wuppertal 1962-1971 Besuch des Staatlichen Gymnasiums Wuppertal 1971 Abitur
Studium:	Wintersemester 1972/73 Beginn des Studiums der Biologie und Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
Diplomvorprüfung im Fach Biologie:	April 1975
Diplomhauptprüfung im Fach Biologie:	Juni 1979
Fächerkombination:	Mikrobiologie (Hptf.) Biochemie (Nbf.) med. Virologie (nicht biol. Nbf.)
Titel der Diplomarbeit:	Reinigung und Charakterisierung eines 74K Proteins in Säugerzellen nach Infektion mit dem onkogenen Virus SV40 und nach Serumstimulation.
Promotion:	Beginn der Promotion Juli 1979 am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Ruhr-Universität Bochum